

COPYRIGHT: 1993, JPO & Japio

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

05172814

July 13, 1993

LABELLED DRUG HAPTEN ANALOGUE FOR IMMUNOASSAY

INVENTOR: DANIELSON SUSAN J; BRUMMOND BARBARA A; OENICK MARSHA D B; PONTICELLO IGNAZIO S; HILBORN DAVID A

APPL-NO: 04145980

FILED-DATE: June 5, 1992

PRIORITY: June 7, 1991 - 91 712330, United States (US); March 16, 1992 - 30, United States (US)

ASSIGNEE-AT-ISSUE: EASTMAN KODAK CO

PUB-TYPE: July 13, 1993 - Un-examined patent application (A)

PUB-COUNTRY: Japan (JP)

IPC-MAIN-CL: G 01N033#535

CORE TERMS: nucleus, coupling, hapten, label, chain, ring, atom, sulfhydryl, hydantoin, analogue, carbonyl, labelled, formula, bonded, amine

ENGLISH-ABST:

PURPOSE: To obtain a labelled drug hapten analogue recognized by an antibody by adding a label having an amine or sulfhydryl group, a drug hapten nucleus selected from a hydantoin nucleus and barbiturate nucleus and a coupling chain.

CONSTITUTION: A labelled drug hapten analogue is constituted of a label having an amine or sulfhydryl group and used in immunoassay, a drug hapten nucleus selected from a hydantoin nucleus and a barbiturate nucleus and a coupling chain coupling a third position of the drug hapten nucleus with the label through a carbonyl bridge. The coupling chain has 5-40 atoms composed of a 5-7- membered heterocyclic ring bonded to a coupling group through a 1-10C alkylene group, a phenylene group and ring nitrogen atoms. Groups and the ring are mutually bonded through a chemical group selected from ester represented by formula 1 (wherein Z is O or S), amide represented by formula 2, a hetero atom selected from -O-, -S- and NR- (wherein R is 1-6C alkyl) and carbonyl and the coupling group is other than a 2-12C saturated or unsaturated monocarboxylic acid derivative.

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-172814

(43)公開日 平成5年(1993)7月13日

(51)Int.Cl.⁴
G 0 1 N 33/535

識別記号

庁内整理番号
8310-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2(全14頁)

(21)出願番号	特願平4-145980	(71)出願人	590000846 イーストマン コダック カンパニー アメリカ合衆国、ニューヨーク14650、ロ チェスター、ステイト ストリート343
(22)出願日	平成4年(1992)6月5日	(72)発明者	スーザン ジーン ダニエルソン アメリカ合衆国、ニューヨーク 14609、 ロチェスター、ラクロワ コート 9
(31)優先権主張番号	7 1 2 3 3 0	(72)発明者	バーバラ エー. ブラモンド アメリカ合衆国、ニューヨーク 14612、 ロチェスター、スウィート アクレス ド ライブ 14
(32)優先日	1991年6月7日	(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外3名)
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	8 5 1 4 3 9		
(32)優先日	1992年3月16日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 イムノアッセイ用標識薬物ハブテン類似体

(57)【要約】

【構成】 本発明は、下記を含んで成る標識薬物ハブテン類似体に向けられている。

(A) アミンもしくはスルフヒドリル基を有する、イムノアッセイに用いられるタイプの標識、(B) ヒダントイン核もしくはバルビツレート核より選ばれる薬物ハブテン核、及び(C) 薬物ハブテン核の3位をカルボニル橋を介して標識に連結する連結鎖。

【効果】 抗体により、確実に認識される標識薬物ハブテン類似体を提供する。上記標識薬物ハブテン類似体は、加水分解に対して安定である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) アミンもしくはスルフヒドリル基を有する、イムノアッセイに用いられるタイプの標識、

(B) ヒダントイン核もしくはバルビツレート核より選ばれる薬物ハブテン核、及び

(C) 薬物ハブテン核の3位をカルボニル橋を介して標識に連結する連結鎖、を含んで成る標識薬物ハブテン類似体であって、上記連結鎖が、

(1) $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン基、

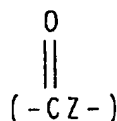
(2) フェニレン基、及び

(3) 環窒素原子を介して連結基に結合した5～7員複素環、

から成る5～40個の原子を有し、上記基及び環が、

(a) エステル

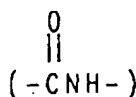
【化1】



(上式中、ZはOもしくはSである)、

(b) アミド

【化2】



(c) $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-NR-$ より選ばれるヘテロ原子(ここで、Rは、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルを表す)、並びに

(d) カルボニル

より選ばれる化学基を介して互いに結合しており、連結基が、炭素原子数2～12個を有する飽和もしくは不飽和モノカルボン酸の誘導体以外のものであることを条件とする標識薬物ハブテン類似体。

【請求項2】 (1) アミンもしくはスルフヒドリル基を有する標識を、

(a) 活性エステル基、例えばスクシンイミドオキシカルボニル、

(b) ヒダントイン核もしくはバルビツレート核より選ばれる薬物ハブテン核、及び

(c) 活性エステル基をヒダントイン核もしくはバルビツレート核に連結する連結鎖(ここで、連結鎖は、請求項1に定義されるものである)を含んで成る過剰の薬物ハブテン類似体と接触させる工程、並びに

(2) 好ましくは透析により、未使用活性エステル及び縮合副生成物を取り除く工程、

を含んで成る先に特許請求したいいずれか1つの標識薬物ハブテン類似体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床化学、詳細にはイムノアッセイに関する。

【0002】

【従来の技術】天然の免疫学的反応を利用するイムノアッセイは、臨床化学における分析技術として広範な使用が見い出されている。反応の特異性により、それらは、生物学的流体中に非常に低濃度で存在する生物学的被検体を定量する際に特に都合が良い。このような被検体としては、例えば、抗体類、治療薬物類、麻酔薬類、酵素類、ホルモン類及びタンパク質類等が挙げられる。

【0003】競合バインディングイムノアッセイでは、免疫適格誘導体類及びリガンドの類似体類を含む標識リガンドが、所定量の適当なバインディング材料(本明細書ではレセプターと称される)を用いる反応において、未標識リガンドと競合して存在する。未知濃度のリガンドは、結合もしくは未結合(すなわち、遊離)の標識リガンドのどちらか一方のシグナルを測定することより求めることができる。反応は以下のように進行する。

20 【0004】リガンド+標識リガンド+レセプター→
リガンド-レセプター+標識リガンド-レセプター

【0005】伝統的な標識としては、放射性標識類、酵素類、色素原類、蛍光団類、安定遊離基類及び酵素のコファクター類、阻害剤類並びにアロステリックエフェクター類が挙げられる。

【0006】前述に矛盾することなく、血清中の薬物誘導体類(例えば、フェノバルビタール及びフェニトイン)についてのイムノアッセイは、固定化抗体バインディング部位について、患者血清中の薬物とこのような薬物の酵素標識類似体との競合に基づくことができる。

30 【0007】標識薬物ハブテン類似体(以下、LDHと称することが多い)についての特定の必要条件は、1) 少なくとも65%のLDHが過剰の固定化抗体により結合されうること; 2) 固定化抗体についてのLDHの親和性が、所定量のLDHと薬物との競合が治療に関連した薬物濃度範囲で発生するようなものであること; 及び 3) 保存条件下におけるその酵素標識の加水分解に対するLDHの安定性; を含む。

【0008】薬物ハブテン類似体に課せられる必要条件は、1) 酵素標識との結合後の固定化抗体に対する類似体の接近しやすさ; 2) 薬物に対する抗体による、標識類似体の特異的認識能; 及び 3) 酵素活性に悪影響を与えない条件下、直接又は酵素もしくは類似体の活性化後のどちらかに、酵素標識を担持する類似体が有する十分な反応性; を含む。

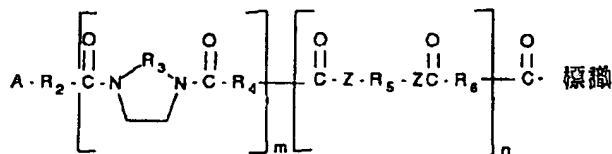
【0009】米国特許第4,752,568号明細書に開示されたグルコースオキシダーゼ(GOD)及びアルカリ性ホスファターゼ(ALP)酵素標識結合フェノバルビタール及びフェニトインハブテン類似体類は、所望のフォーマットで有効な競合イムノアッセイを遂行する

のに適切な酵素標識類似体を提供した。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】標識として酵素西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を用いる場合に、上記特許に開示された標識フェノバルビタール及びフェントイン類似体類が、競合イムノアッセイを遂行するのに不十分であることが課題である。このような類似体とHRP間のカブリング反応は、緩慢かつ不完全であった。更に、フェノバルビタール及びフェントインHRP標識は非常に弱い結合であったので、判読可能なシグナルを得*10

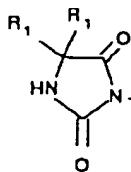
(I)



【0013】上式中、Aは、次式のヒダントイン核

【0014】

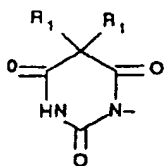
【化4】



【0015】もしくは次式のバルビツレート核を表し、

【0016】

【化5】



【0017】R¹ は、各々独立して、水素、炭素原子数1～10個のアルキル、未置換もしくは置換フェニルを表し、R²、R³、R⁴及びR⁵は、各々独立して、C₁～C₁₀のアルキレンもしくは少なくとも1つ以上のエステル基、アミド基、-O-、-S-、又は-NR-を割り込ませたこのようなアルキレン基を表し、R⁶は、C₁～C₃のアルキレンを表し、Zは、-O-、-S-、及び-NR-（ここで、Rは、水素もしくはC₁～C₃のアルキル、例えば、メチルプロピル及びヘキシルを表す）を表し、mは、0、1もしくは2でありnは、0、1もしくは2でありm+n>0、そしてm、n及びR¹に含まれる原子の総数が5～40であり、標識は、酵素であり、そして更に、(i) 少なくとも1つのR¹基が置換もしくは未置換フェニルであり、(ii) R⁴、

* るのに非常に高濃度の標識もしくは抗体結合部位が必要とされるであろう。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、本明細書の請求項1に記載される構造を有する標識薬物ハブテン類似体を提供する。請求項1の標識薬物ヒダントイン及びバルビツレート誘導体類は、次式に従うものを含む。

【0012】

【化3】

R⁵及びR⁶の1つがフェニレンであってもよく、(ii) 構造Iの角型括弧成分類が、いずれかの順序でそこに表示でき、そして(iv) 連結基が、炭素原子数2～12個の飽和もしくは不飽和モノカルボン酸の誘導体以外のものであることを条件とする。

【0018】上記定義に従って、R¹は、水素、メチル、プロピル、ヘキシル、デシル、未置換フェニルもしくは炭素原子数1～6個のアルキル、ニトロ、ハロゲン、シアノ及び炭素原子数1～6個のアルコキシで置換されたフェニルで表すことができ、R²、R³、R⁴及びR⁵は、各々独立してエチレン、ブチレン、ペンチレン、オクチレンもしくは少なくとも1つ以上のエステル基、アミド基、-O-、-S-、及び-NR-を割り込ませたこのようなアルキレンより選ばれるアルキレンを表し、R⁶は、メチレン、エチレンもしくはトリメチレンを表し、Zは、各々独立して、-O-、-S-、もしくは-NR-（ここで、Rは、少なくとも1つの水素、メチル、プロピルもしくはヘキシルを表す）を表し、そして標識は、酵素を表す。

【0019】標識薬物ハブテン類似体類は、以下に記載される新規薬物ハブテン類似体類より製造した。

【0020】それらは一般的に下記を含んで成る。

(a) 活性エステル基、例えば、スクシンイミドオキシカルボニル、(b) ヒダントイン核もしくはバルビツレート核、及び(c) 活性エステル基をヒダントイン核もしくはバルビツレート核に連結する連結鎖（ここで、連結鎖は、先に定義のとおりである）。

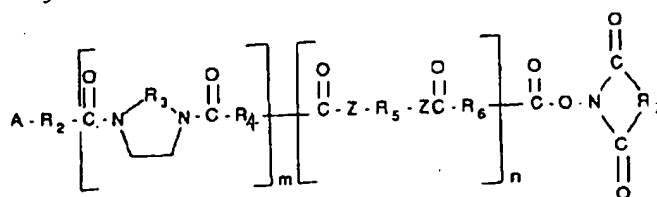
【0021】より詳細には、本発明の好ましい新規ヒダントイン活性エステル類は、次式に従うものである。

【0022】

【化6】

5

6



【0023】上式中、A、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、Z、m及びn並びにそれらに関連する条件は、先に定義のとおりであり、そしてR⁷は、エチレンもしくは α -フェニレン基である。

【0024】製造例

ヒダントイン薬物ハブテン類似体類

ヒダントイン類似体類は、フェニトイン類似体類、ヒダントイン化合物類の下位分類、が製造される下記製造方法に従って製造できる。

【0025】1. HD1:5, 5-ジフェニル-3-(4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニルオキシ)エチルアミノカルボニル]ブチル)ヒダントインの製造。

【0026】工程1:5, 5-ジフェニル-3-(4-(2-ヒドロキシエチルアミノカルボニル)ブチル)ヒダントインの製造。

【0027】パートA:最初に酸塩化物を製造する。3-(4-カルボキシブチル)-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオン (3.52g, 0.01モル)、塩化チオニル (20mL)、N, N-ジメチルホルムアミド (2滴) 及びクロロホルム (50mL) の混合物を、室温で3時間攪拌した。減圧下、ロータリーエバポレーターで溶剤を除去して、そしてこの生成物を次のパートBに直接用いた。

【0028】パートB:酸塩化物をエタノールアミンと反応させる。クロロホルム (50mL) 中の酸塩化物を、クロロホルム100 (mL) 中エタノールアミン (1.2g, 0.02モル)、及びトリエチルアミン (2.4g, 0.024モル) の混合物に15分間かけて滴下し

た。次いで混合物を60℃で2時間加熱し、そして室温で1時間攪拌した。次いでその溶液を5%塩酸 (100mL×2) で洗浄し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (100mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥して濾過し、そして溶剤をロータリーエバポレーターで除去した。次いで濾液を酸化アルミニウムカラムを用いるクロマトグラフィーにかけ、TLC上に1つのスポットを示す物質 (3.0g) を得た。この物質を次の製造方法に直接使用した

【0029】工程2:3-(4-(2-(3-カルボキシプロピオニルオキシ)エチルアミノカルボニル)ブチル)-5, 5-ジフェニルヒダントインの製造。

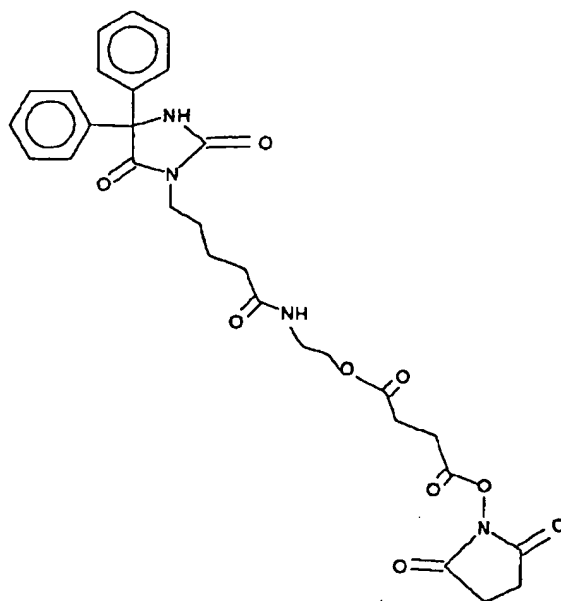
クロロホルム (100mL) 中工程1のヒドロキシ化合物 (3.0g, 0.0075モル)、無水コハク酸 (1.0g, 0.01モル) 及びジメチルアミノピリジン (0.9g, 0.0075モル) を50~60℃で4時間加熱し、そして週末の間に室温まで冷却した。

【0030】ジクロロメタン (300mL) を添加し、そして混合物を5%塩酸溶液 (100mL×3) で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液 (100mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥して濾過し、そして溶剤を除去してTLC上に1つのスポットを与える物質を得た。

【0031】工程3:HD1:5, 5-ジフェニル-3-(4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニルオキシ)エチルアミノカルボニル]ブチル)ヒダントインの製造。

【0032】

【化7】



【0033】クロロホルム（80 mL）中工程2由来の酸（3.0 g, 0.006モル）、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（1.5 g, 0.007モル）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（0.7 g, 0.006モル）の混合物を室温で20時間攪拌した。その混合物を濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーターで濾液を濃縮した。次いで残渣をシリカを用いるクロマトグラフィーにかけ、生成物を1.3 g得た（収率40%）。C₃₀H₃₂N₂O₄についての分析計算値：C, 60.8; H, 5.44; N, 9.45。実験値：C, 59.6; H, 5.51; N, 8.91。

【0034】2. HD2: 5, 5-ジフェニル-3-{4-[4-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル]ブチル}-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0035】工程1: 5, 5-ジフェニル-3-(1-ビベラジニルカルボニルプロチル)ヒダントインの製造。

【0036】パートA: 最初に、3-{4-[4-(ベンジルオキシカルボニルビベラジニルカルボニル)ブチル]-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオンを製造した。上記HD1の製造のパートAに記載されるように製造した酸塩化物（0.01モル）を、クロロホルム（50 mL）中ベンジル1-ビベラジニルカルボキシレート（2.4 g, 0.011モル）及びトリエチルアミン（2.0 g, 0.02モル）の混合物に、15分間かけて滴下した。この混合物を室温で一晩攪拌し、そしてジクロロメタン（300 mL）を添加した。その混合物を5%塩酸（100 mL×2）で洗浄し、希炭酸ナトリウム溶液（100 mL）で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液（100 mL）で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで溶液を乾燥し、濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーターで溶剤を除去した。次いで濾液をクロマトグラフィ

ーにかけ、油状物4.3 gを得た（収率78%）。これを次の工程に直接使用した。

【0037】工程B: 工程Aの保護アミン（4.8 g, 0.008モル）及び30~35%臭化水素酢酸溶液（25 mL）を室温で1.5時間攪拌した。次いでこの混合物をジエチルエーテル（1 L）に注ぎ入れ、そして分離した油状物を新たなエーテル（1 L×3）で摩砕した。その油状物を10%水性水酸化ナトリウム（pH=14）に溶解し、そして水性溶液をジクロロメタン（100 mL×4）で抽出した。合わせた有機溶液を飽和塩化ナトリウム溶液（150 mL）で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下、ロータリーエバポレーターで溶剤を除去した。濾液を凝固させると白色固体が得られた（2.6 g, 収率77%）。この物質を次の工程に直接用いた。

【0038】工程2: 3-{4-[4-(3-カルボキシプロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル]ブチル}-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0039】クロロホルム（15 mL）中製造方法7由来のアミン（2.1 g, 0.005モル）及び無水コハク酸（0.54 g, 0.0054モル）を50~60℃で30分間加熱し、そして周囲温度で20時間放置した。ジクロロメタン（150 mL）を添加し、そして混合物を5%塩酸（100 mL×2）で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液（100 mL）で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーターで溶剤を除去したところ、白色固体2.5 g（95%）が得られ、これを次の工程に直接用いた。

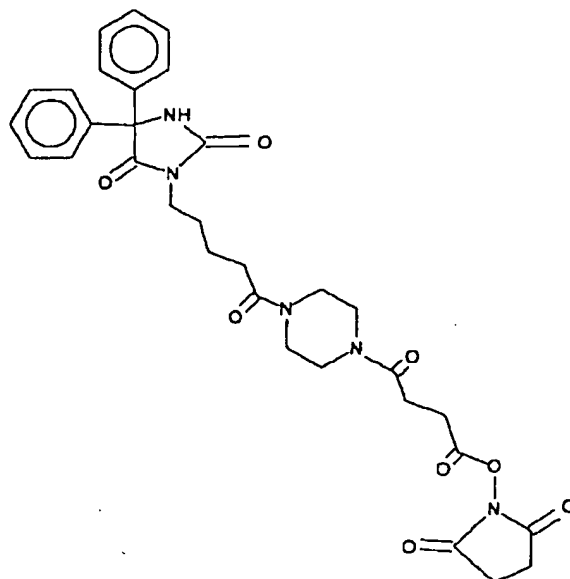
【0040】工程3: HD2: 5, 5-ジフェニル-3-{4-[4-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル]ブチル}

ル}-2,4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0041】

*【化8】

*



【0042】クロロホルム（40 mL）中工程2由来の酸（1.56 g, 0.003 mol）、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（0.64 g, 0.003 mol）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（0.36 g, 0.003 mol）の混合物を室温で週末の間攪拌した。その混合物を濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーターで濾液から溶剤を除去して生成物1.9 gを得た（収率100%）。その固体をクロマトグラフィーにかけ、そして生成物画分をジクロロメタン（200 mL）に溶解し、希炭酸ナトリウム溶液（100 mL×2）で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そしてロータリーエバポレーターで溶剤を除去したところ、TLC上に1つのスポットを与える白色固体が得られた。C₃₀H₃₃N₃O₅の分析計算値：C, 62.23；H, 5.71；N, 11.34。実験値：C, 59.07；H, 5.40；N, 10.45。

【0043】3. HD3：5, 5-ジフェニル-3-{4-[6-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオンアミド)ヘキシルアミノカルボニル]ブチル}-2,4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0044】工程1：3-{4-[6-アミノヘキシルアミノカルボニル]ブチル}-5, 5-ジフェニル-2,4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0045】パートA：3-{4-[6-ベンジルオキシカルボニルアミノヘキシルアミノカルボニル]ブチル}-5, 5-ジフェニル-2,4-イミダゾリジンジ

オンの製造。

HD1の製造で中間体として生成される酸塩化物を、HD2の製造の工程1に記載の方法により、N-ベンジロキシカルボニル-1, 6-ヘキサンジアミンで処理したところ、保護アミン7.5 g、収率85%が得られた。

【0046】パートB：パートAの保護アミンを、HD2の製造の工程1、パートBの方法により臭化水素酸-酢酸で処理したところ遊離アミンが得られ、精製することなくそれを工程2に用いた。

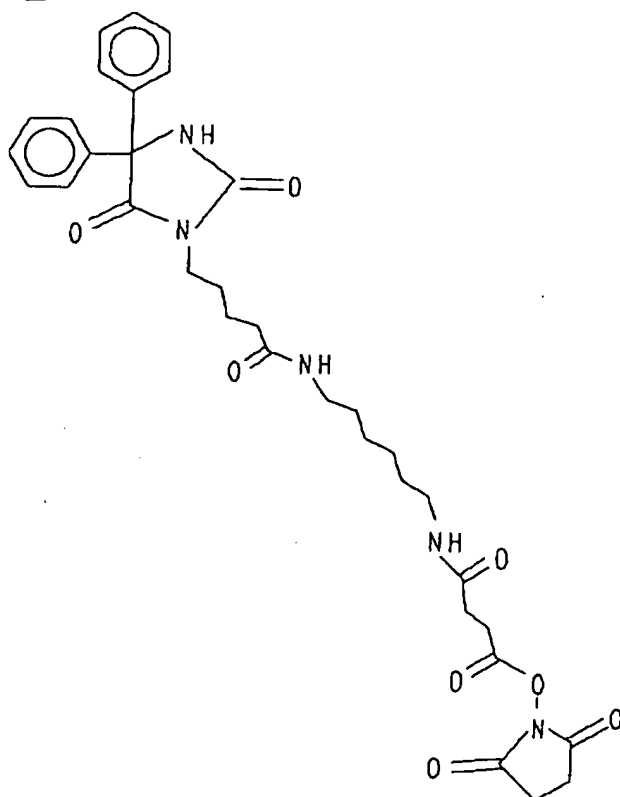
【0047】工程2：3-{4-[6-(3-カルボキシプロピオンアミド)ヘキシルアミノカルボニル]ブチル}-5, 5-ジフェニル-2,4-イミダゾリジンジオンの製造。

この化合物を、HD2の製造の工程2と同様の方法を用いて製造した。C₃₀H₃₃N₃O₅についての分析計算値：C, 65.44；H, 6.96；N, 10.17。実験値：C, 63.26；H, 7.01；N, 9.39。

40 【0048】工程3：HD3：5, 5-ジフェニル-3-{4-[6-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオンアミド)ヘキシルアミノカルボニル]ブチル}-2,4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0049】

【化9】



【0050】この物質を、HD2の製造の工程3の方法を用いて製造したところ、生成物2.6gを得た(収率80%)。融点133~134℃。C₃₁H₄₁N₃O₅。についての分析計算値：C, 63.05; H, 6.38; N, 10.81。実験値：C, 62.91; H, 6.41; N, 10.69。

【0051】バルビツレート薬物類似体類

以下の製造例4~8は、フェノバルビタールについてのバルビツレート薬物ハブテン類似体類の製造を具体的に説明するものである。一般的には、類似体類は、(1)バルビツレート誘導体、例えば、フェノバルビタールを、オメガ-ハロアルカンカルボキシレートエステルと縮合させる工程、(2)そのエステルを、対応する酸にケン化させる工程、(3)その酸を、対応する酸塩化物に転化させる工程、及び(4)酸塩化物をN-ヒドロキシスクシンイミドと縮合させる工程、又は更に長い連結鎖を得るために、ブロックされたアミンもしくはヒドロキシ基を1つ有するジアミン、ジオールもしくはアミノアルコールと縮合させる工程、(5)ブロックを取り除き、ジカルボン酸、例えばコハク酸と縮合させ、次いでN-ヒドロキシスクシンイミドと縮合させて、類似体を製造する工程、により製造される。

【0052】所望であれば、半ブロックのジアミン、ジオールもしくはアミノアルコールと縮合させ、次いで別の二酸を一回もしくは2回以上繰り返し処理して、連結鎖を更に長くできる。しかしながら、同様の製造が、よ

り長い鎖の二酸類、ジオール類、ジアミン類、アミノアルコール類もしくはハロアルカンカルボキシレートエステル類を用いることにより、より少ない工程で達成できる。

【0053】4. PB1: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[4-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニル)-1-ピペラジニルカルボニル]ブチル}-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオンの製造。

【0054】工程1: 5-エチル-6-ヒドロキシ-3-(4-メトキシカルボニルプロチル)-5-フェニル-2, 4(3H, 5H)-ピリミジンジオンの製造。

ジクロロメタン(500mL)中フェノバルビタール(46.5g, 0.2モル)及び水酸化テトラブチルアンモニウム(500mL, 0.2モル, 0.4M水溶液)の混合物を製造し、そしてそれに5-プロモ吉草酸メチル(39.0g, 0.2モル)を添加した。その反応混合物を一晩(20時間)激しく攪拌した。この混合物に、飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)を添加し、有機層を分離し、そして水性溶液をジクロロメタン(100mL×2)で洗浄した。合わせた有機溶液を飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥し、濾過し、そして溶剤を除去した。

【0055】工程2: 3-(4-カルボキシプロチル)-5-エチル-6-ヒドロキシ-5-フェニル-2, 4(3H, 5H)-ピリミジンジオンの製造。

ジオキサン (500 mL) 中の工程1の5-エチル-6-ヒドロキシ-3-(4-メトキシカルボニルブチル)-5-フェニル-2,4(3H,5H)-ピリミジンジオンエステル (54.0 g, 0.156 mol)、濃塩酸 (55 mL) 及び水 (55 mL) の混合物を4時間加熱還流し、そして室温で一晩放置した。ジオキサンを減圧下で除去し、そして飽和塩化ナトリウム溶液 (250 mL) 及びジクロロメタン (400 mL) を残渣に加えた。有機層を分離し、そして水性溶液をジクロロメタン (150 mL × 3) で抽出した。合わせた有機溶液を飽和塩化ナトリウム溶液 (200 mL) で洗浄し、無水MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして溶剤を取り除いた。残渣にジエチルエーテルを添加し、そしてその混合物を週末の間-16℃の冷凍庫に置き、次いで濾過した。

【0056】工程3: 1-(4-クロロカルボニルブチル)-5-エチル-5-フェニル-2,4,6(1H,3H,5H)-ピリミジントリオンの製造。

製造2由来の酸 (6.6 g, 0.2 mol)、塩化チオニル (50 mL)、N,N-ジメチルホルムアミド (2滴) 及びクロロホルム (80 mL) の混合物を室温で1.5時間攪拌した。減圧下ロータリーエバポレーターで溶剤を除去し、そしてこの生成物を次の工程4に直接用いた。

【0057】工程4: 1-(4-(4-ベンジルオキシカルボニル-1-ビベラジニルカルボニル)ブチル)-5-エチル-5-フェニル-2,4,6(1H,3H,5H)-ピリミジントリオンの製造。

クロロホルム (75 mL) 中工程3の酸塩化物 (0.2 mol) を、クロロホルム (100 mL) 中ベンジル1-ビベラジニルカルボキシレート (6.0 g, 0.030 mol) 及びトリエチルアミン (4.0 g, 0.04 mol) の混合物に15分間かけて滴下した。この混合物を室温で20時間攪拌し、次いでジクロロメタン (300 mL) を添加した。その混合物を10%塩酸溶液 (100 mL × 3) で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液 (100 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして溶*

*剤を除去した。次いで残渣をSiO₂でのクロマトグラフィーにかけて固体を得た。

【0058】工程5: 5-エチル-5-フェニル-1-(4-(1-ビベラジニルカルボニル)ブチル)-2,4,6(1H,3H,5H)-ピリミジントリオンの製造。

製造4由来の保護アミン (6.5 g, 0.012 mol) 及び30~35%臭化水素酢酸溶液 (30 mL) を室温で1.5時間攪拌した。次いでその混合物を酢酸エチル (2 L) 中に注ぎ入れ、1時間攪拌し、濾過し、そして固体を酢酸エチル500 mLで洗浄した。

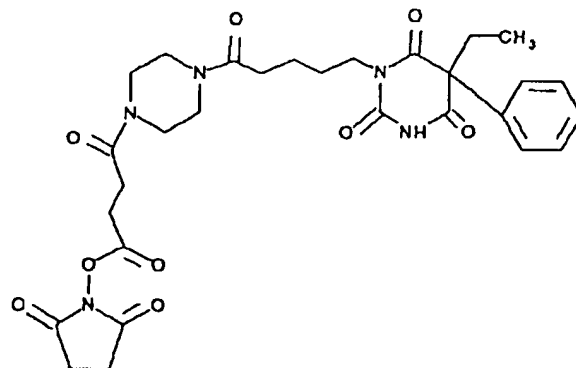
【0059】工程6: 1-(4-(4-(3-カルボキシプロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル)ブチル)-5-エチル-5-フェニル-2,4,6(1H,3H,5H)-ピリミジントリオンの製造。

クロロホルム (150 mL) 中、工程5のアミン (4.8 g, 0.01 mol)、無水コハク酸 (1.2 g, 0.012 mol) 及びトリエチルアミン (2.2 g, 0.02 mol) を、50~60℃で30分間加熱し、(温水) として周囲温度で16時間攪拌した。ジクロロメタン (200 mL) を添加し、その混合物を10%塩酸溶液 (100 mL × 3) で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液 (100 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーターで溶剤を除去すると、白色固体3.3 gが得られた (収率66%)。この物質をSiO₂カラムを用いるクロマトグラフィーにかけたところ、白色固体が得られた。

【0060】工程7: 5-エチル-5-フェニル-1-(4-(4-(3-スクシンイミドオキシカルボニル)プロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル)ブチル)-2,4,6(1H,3H,5H)-ピリミジントリオンの製造。

【0061】

【化10】



【0062】クロロホルム (75 mL) 中工程6由来の酸 (3.4 g, 0.007 mol)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (1.6 g, 0.008 mol) 及びN-ヒドロキシスクシンイミド (1.0 g, 0.00

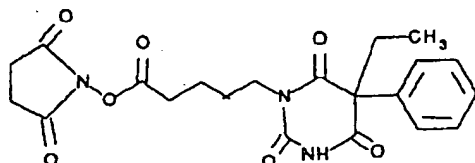
8 mol) を室温で20時間攪拌した。その混合物を濾過し、そして酢酸エチル (100 mL) を添加した。その有機溶液を水 (100 mL × 2) で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液 (50 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで

乾燥し、濾過し、そして減圧ロータリーエバポレーターで溶剤を除去した。固体部分をクロマトグラフィーにかけたところ、白色固体が得られた。

【0063】5. PB2: 5-エチル-5-フェニル-2-(4-スクシンイミドオキシカルボニル)ブチル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

【0064】

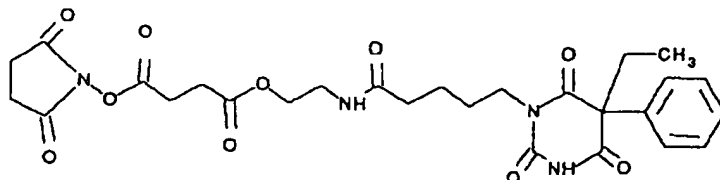
【化11】



【0065】工程2の酸と攪拌すること以外は、製造例4、工程7の方法を用いてこの物質を製造した。その物質をエチルエーテル/酢酸エチル(1:1)から結晶化したところ、白色固体が得られた。

【0066】6. PB3: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニル)プロピオンオキシ]エチルアミノカルボニル}ブチル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

【0067】工程1: 5-エチル-1-[4-(2-ヒドロキシエチルアミノカルボニル)ブチル]-5-フェニル



【0071】本例の工程2の酸を用いて開始する、製造例4の工程7に概略された方法を用いて、この物質を製造した。

【0072】7. PB4: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[3-(3-スクシンイミドオキシカルボニル)プロピルアミノカルボニル]ブチル}-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

【0073】工程1: 1-[4-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノプロピルアミノカルボニル)ブチル]-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

ベンジル1-ビペラジンカルボキシレート^{*}の代わりにN-ベンジルオキシカルボニル-1, 3-プロパンジアミンを用いる以外は、製造例4の工程4に概略された方法を用いてこの物質を製造し、そして粗物質を次の工程に用いた。

【0074】工程2: 1-[4-(3-アミノプロピル

ニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{}の製造。

ベンジル1-ビペラジンカルボキシレート^{*}の代わりに2-ヒドロキシエチルアミンを用いる以外は、製造例4の工程4に概説されたようにこの物質を製造した。

【0068】工程2: 1-[4-(2-(3-カルボキシプロピオンオキシ)エチルアミノカルボニル)ブチル]-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

10 クロロホルム(100ml)中、工程1由来の生成物(2.9g, 0.007mol)、無水コハク酸(0.7g, 0.007mol)及びジメチルアミノピリジン(0.9g, 0.007mol)を温水(50~60℃)で30分間加熱し、次いで室温で3日間攪拌した。ジクロロメタン(300ml)を添加し、そして混合物を10%塩酸溶液(100ml×2)で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液(100ml)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして溶剤を除去したところ、油状物が得られ、それを次の工程に直接用いた。

【0069】工程3: PB3: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニル)プロピオンオキシ]エチルアミノカルボニル}ブチル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

【0070】

【化12】

アミノカルボニル)ブチル]-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

製造例4の工程5のようにこの物質を製造した(本例の工程1のアミドを用いて開始し、エチルエーテル中に注ぎ入れた時に油状物が得られたことを除く)。

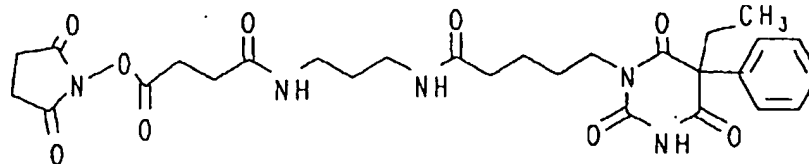
【0075】工程3: 1-[4-[3-(3-カルボキシプロピオンアミド)プロピルアミノカルボニル]ブチル]-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

本例の工程2由来のアミンを用いて開始し、酸が得られたこと以外は、製造例4の工程6の方法により、この物質を製造した。

【0076】工程4: PB4: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[3-(3-スクシンイミドオキシカルボニル)プロピルアミノカルボニル]ブチル}-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン^{*}の製造。

【0077】

* * 【化13】



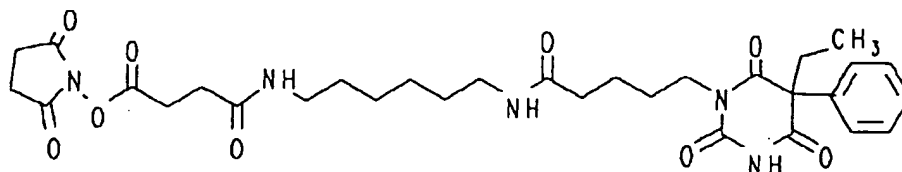
【0078】本例の工程3の酸を用いて開始する以外は、製造例4の工程7の方法を用いてこの物質を製造した。

【0079】8. PB5: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-(6-(3-スクシンイミドオキシカルボニル

※ルプロビオンアミド)ヘキシルアミノカルボニル}ブチル}-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン

【0080】

【化14】



【0081】工程1では、ベンジルオキシカルボニル-1, 3-プロパンジアミンの代わりにN-ベンジルオキシカルボニル-1, 6-ヘキサジアミンを使用し、そしてその後の製造例7の工程2, 3及び4では各々反応生成物を用いること以外は、製造例7の反応順序に従ってこの化合物を製造した。

【0082】

【具体的な態様】本発明者らは、バルビツレート類及びヒダントイン薬物類、特にフェノバルビタール及びフェニトインについての競合イムノアッセイに有用である、先に製造したバルビツレート及びヒダントイン類似体類の新規標識薬物ハブテン類似体類を製造した。標識類は、競合イムノアッセイで被検体もしくは被検体類似体と共に通常用いられる、アミンもしくはスルフヒドリル基を担持するイムノアッセイで常用されるもの、例えば、酵素類、可視色素類、ロイコ色素類、蛍光色素類及び放射性物質類等である。

【0083】有用な標識は、酵素類、例えば、アルカリ性ホスファターゼ(ALP)、グルコースオキシダーゼ(GOD)及び西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)もしくはアミン富化西洋ワサビペルオキシダーゼ(AHRP)である。

【0084】標識薬物ハブテン類似体類は、下記工程を含んで成る新規方法を用いて製造される。

1) 求核基、例えばアミンもしくはスルフヒドリル基を表面上に担持する標識を、過剰の上記バルビツレートもしくはヒダントイン薬物ハブテン類似体と接触させる工程。好ましくは類似体及び標識を水混和性有機溶剤、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド(DMSO)もしくは溶剤及び水の混合物に溶解し(緩衝化)、その後一緒に混合する工程、及び

2) 未使用活性エステル及び縮合副生成物を、好ましく

は透析により取り除く工程。

【0085】

【実施例】本明細書の以下に提供される例は、本発明の新規標識類似体類の製造方法を具体的に説明するものである。標識類似体類は、フェニトイン及びフェノバルビタール薬物ハブテン類似体類を用いて製造した。

【0086】例1-アミン富化HRP標識ヒダントインHD1(伸長連結鎖、標識AHRP-HD1、標識Aを含む)の製造。

【0087】HD1を、10ミリモル4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む乾燥DMF(DMF 4'-H A) 1.452 mLに溶解した。

【0088】アミン富化HRPを以下のように製造した。乾燥HRPを0.1モルMES緩衝液、pH5.5に溶解して、緩衝液10 mL中の最終濃度が 2.5×10^{-6} モル(100 mg)となるようにした(MES=2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)。伝統的なファクター A_{405} , 1 mg/mL=2.24を用いて A_{405} 、測定法によりタンパク質濃度を求めた。HRP溶液を、0.1モルMES緩衝液pH5.5、10 mL中に溶解したL-リジン塩酸塩 1.5×10^{-3} モル(275 mg)と合わせた。

40 新たに調整したMES緩衝液中1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC, 5×10^{-4} モル、960 mg)の溶液を添加した。容器にフタをし、そして室温で一晩混合した。その反応生成物を再び0.02モルMOPS緩衝液、pH7.0(3 L、10°C)で透析した。透析緩衝液を3回変えた。MOPS=3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸。

【0089】反応させる前に、アミン富化HRPの試料を、30,000 NMWL(呼称分子量制限分離)セントリセル(Centrifuge)遠心用ウルトラフィルターを用いて、MOPS緩衝液から0.1モルEP

PS緩衝液、pH8.0に交換した。次いで、この試料を希釈して、最終濃度10mg/mLの溶液を得た。

【0090】アミン富化HRP (AHRP) (1mL) をジメチルホルムアミド中4'-ヒドロキシアセトアニリドの10ミリモル溶液 (DMF 4'-HA) 500μLと、ボルテックスで混合しながら合わせ、次いでそれを42℃の水浴中に設置した。乾燥DMF 4'-HA溶液1.452mL中にHD1を21mg溶解することにより調整したHD1溶液 (500μL) を、ボルテックスで混合しながらAHRPに滴下したので、フェニトイン/HRPのモル比は、50/1となった。その反応混合物を、42℃の水浴中で穏やかに振動させながら1時間インキュベーションした。

【0091】その反応混合物をSpectrapor #2透析管に入れ、更なるDMF 4'-HA/0.1モルEPPS (1:1) 0.5mLを用いて反応容器をすすぎ、そのすすぎ液も一緒に透析管に入れた。

【0092】反応混合物を以下のように透析した。

- a) 1LのDMF 4'-HA/0.1モルEPPS (1:1)、pH8.0を用いて42℃で1時間、
 - b) 透析条件a)を用いてもう1回繰り返す、
 - c) 2Lの0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む0.1モルEPPS、pH8.0を用いて8℃で15時間
 - d) 2Lの0.1モルEPPS、pH8.0を用いて8℃で3時間、
 - e) 3Lの0.04モル トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 (トリスHCl) /0.15モルNaCl、pH7.5を用いて8℃で3時間、そして
 - f) 透析条件e)を用いて3時間、もう1回繰り返す。
- 【0093】透析後、0.02%メルチオレート (merthiolate) (商標) を防腐剤として添加し、そしてAHRP-HD1を冷蔵保存した。

【0094】例2-アミン富化HRP標識HD2 (アミド結合を伴う伸長連結鎖、標識AHRP-HD2、標識Bを含む) の製造。

【0095】HD2 (15.5mg) を、10ミリモル4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む乾燥DMF (DMF 4'-HA) 1.031mLに溶解した。

【0096】標識製造例1に記載されるように製造したAHRPの溶液 (10mg/mL、0.1モルEPPS溶液、pH8.0を1mL) を、DMF 4'-HA 500μLと、ボルテックスで混合しながら合わせ、次いでそれを42℃の水浴中に設置した。上記HD2溶液 (500μL) を、ボルテックスで混合しながらAHRPに滴下したので、モル比は50/1となった。その反応混合物を、42℃の水浴中で穏やかに振動させながら1時間インキュベーションした。

【0097】その反応生成物をSpectrapor #2透析管に入れ、そして以下のように透析した。

- a) 1LのDMF 4'-HA/0.1モルEPPS (1:1)、pH8.0を用いて42℃で1時間、
- b) 透析条件a)を用いてもう1回繰り返す、
- c) 1.5Lの0.1%BSAを含む0.1モルEPPS、pH8.0を用いて8℃で1.5時間
- d) 1.5Lの0.1モルEPPS、pH8.0を用いて8℃で18時間、
- e) 1.5Lの0.04モル トリスHCl/0.15モルNaCl、pH7.5を用いて8℃で2時間、そして
- f) 透析条件e)を用いて4時間、もう1回繰り返す。

【0098】透析後、0.02%メルチオレート (商標) を防腐剤として添加した。標識ヒダントイン誘導体を冷蔵庫に保存した。

【0099】例3-AHRP-HD3 (アミド結合を伴う伸長連結鎖、標識AHRP-HD3、標識Cを含む) の製造。

【0100】HD3 (9.2mg) を、10ミリモル4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む乾燥DMF (DMF 4'-HA) 1mLに溶解した。

【0101】標識製造例1に記載されるように製造したAHRPの溶液を、0.1モルEPPS緩衝液、pH8.0で透析した。最終濃度が5.71mg/mLとなるようにした。

【0102】AHRP (1mL) をボルテックスで混合しながらDMF 4'-HA 500μLと合わせ、次いでそれを42℃の水浴中に設置した。上記HD3溶液 (500μL) を、ボルテックスで混合しながらAHRPに滴下したので、HD3/AHRPのモル比は50/1となった。その反応混合物を42℃の水浴中で穏やかに振動させながら1時間インキュベーションした。その反応混合物をSpectrapor #2透析管に入れ、更なるDMF 4'-HA/0.1モルEPPS (1:1) 0.5mLを用いて反応容器をすすぎ、そのすすぎ液も一緒に透析管に入れた。

【0103】反応混合物を以下のように透析した。

- a) 1LのDMF 4'-HA/0.1モルEPPS (1:1)、pH8.0を用いて42℃で1時間、
- b) 透析条件a)を用いてもう1回繰り返す、
- c) 1.5Lの0.1%BSAを含む0.1モルEPPS、pH8.0を用いて5℃で15時間
- d) 1.5Lの0.1モルEPPS、pH8.0を用いて8時間、
- e) 2Lの0.02モル3-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS)、pH7.0を用いて5℃で13時間、そして
- f) 透析条件e)を用いて2回繰り返す。

【0104】透析後、0.02%メルチオレート (商標) を防腐剤として添加し、そしてその標識生成物を冷蔵保存した。

【0105】標識バルビツレート薬物ハブテン類似体類

以下の例は、標識バルビツレート薬物ハブテン類似体の製造を具体的に説明するものである。

【0106】例4-アミン富化HRP標識PB2（標識AHRP-PB2、標識D）の製造。

PB2をDMSOに溶解して10.7mg/mL溶液（ 1.25×10^{-3} モル）を得た。次いでこの溶液の500 μ Lを、ボルテックスで混合しながらアミン富化HRP/DMSO溶液（AHRP/DMFと同様に調整される）に滴下した。フェノバルビタール/HRPのモル比は50/1であった。

【0107】2400rpmで振動させながら室温で4時間インキュベーションを行った。その試料をSpectrapor #2透析管に移し、更に透析後1mLを用いて反応容器をすすぎ、そのすすぎ液も一緒に透析管に入れた。標識を0.02モルMOPS緩衝液、pH7.0を用いて5~10℃で透析した。この透析条件を、各回とも2~3Lの緩衝液を用いて3回繰り返した。透析後、0.02%メルチオレート（商標）を防腐剤として添加し、そして標識を冷蔵保存した。

【0108】例5-アミン富化HRP-PB3（伸長連結鎖を含むAHRP-PB3、標識E）の製造。

アミン富化HRPを、セントリセル（Centrice 11）遠心用ウルトラフィルター（30,000呼称分子量制限）を用いてMOPS緩衝液から0.1モルEPPS緩衝液、pH8.0に交換した。次いでこの試料を4.6mL、0.743mg/mLまで希釈した。

【0109】HRP1mLを小バイアルに入れた（ 1.85×10^{-3} モル）。10ミリモル4'-ヒドロキシアセトアニリドを含むジメチルホルムアミド（Aldrich 22,705~6）（DMF 4'-HA）500 μ Lをバイアルに添加し、ボルテックスで混合し、そして42℃の水浴に設置した。

【0110】一方、PB-3を、DMF 4'-HAに溶解して2.12mg/mL溶液（ 3.70×10^{-3} モル）を得た。この溶液500 μ Lを、ボルテックスで混合しながらHRP/DMF 4'-HA溶液に滴下した。フェノバルビタール/HRPのモル比は、100/1であった。

【0111】水浴中で穏やかに振動させながら42℃で1時間インキュベーションを行った。その試料をSpectrapor #2透析管に移し、更にDMF 4'-HA/0.1モルEPPS（1:1）1mLを用いて反応容器をすすぎ、そのすすぎ液も一緒に透析管に入れた。

【0112】反応混合物を以下のように透析した。

- 1LのDMF 4'-HA/0.1モルEPPS（1:1）、pH8.0を用いて42℃で1時間、
- 透析条件a）を用いてもう1回繰り返す、
- 1.5Lの0.1%BSAを含む0.1モルEPPS、pH8.0を用いて5℃で一晩
- 1.5Lの0.1モルEPPS、pH8.0を用いて

5℃で8時間、

e) 2Lの0.02モルMOPS、pH7.0を用いて5℃で少なくとも8時間、そして

f) 透析条件e）を用いて2回繰り返す。

【0113】透析後、0.02%メルチオレート（商標）を防腐剤として添加し、そしてその標識生成物を冷蔵保存した。

【0114】例6-アミン富化HRP-PB1（標識AHRP-PB1、標識F、アミド結合を伴う伸長連結鎖を含むフェノバルビタールハブテン類似体の活性エステル）の製造。

【0115】製造したアミン富化HRPを、0.1モルEPPS緩衝液、pH8.0に交換して10mg/mLの溶液（ 2.5×10^{-4} モル）を得た。標識Fを、アミン富化HRP 5mL（50mg）を用いて製造した。磁気攪拌プレートで攪拌しながら、DMSO 2.5mLをゆっくりと添加した。その溶液を室温で15分間攪拌した。

【0116】一方、PB1をDMSOに溶解して14.9mg/mL溶液を得た。この溶液2.5mLを、HRP/DMSO溶液に攪拌しながらゆっくり添加した。フェノバルビタール/HRPのモル比は50/1であった。

【0117】2400rpmで振動させながら室温で5時間インキュベーションを行った。その試料をSpectrapor #2透析管に移し、更に透析液を用いて反応容器をすすぎ、そのすすぎ液も一緒に透析管に入れた。標識を0.02モルMOPS緩衝液、pH7.0を用いて5~10℃で透析した。この透析条件を、各回とも3Lの緩衝液を用いて3回繰り返した。透析後、0.02%メルチオレート（商標）を防腐剤として添加し、そして標識を冷蔵保存した。

【0118】免疫適格性

以下の例は、上記標識1~6の免疫適格性を具体的に示すものである。

【0119】例7-標識AHRP-HD1（標識A）の免疫適格性。

本例では、標識製造例1）由来のAHRP-HD1（標識A）を結合する、数種の固定化抗体（DilAs₁, DilAs₂, DilAs₃, DilAs₄,及びDilAs₅）の能力を検討する。

【0120】(a) ポリマービーズ試料（各試料が、それに共有結合した先に同定された型の抗体の1つを担持する）を、1987年8月3日に出願された米国特許第081,206号明細書（EPA88 307172, 2発行）に記載される方法及び材料を用いて製造した。

【0121】(b) AHRP-HD1（標識A）を結合する固定化抗体の能力を以下のように測定した。各種の抗体ビーズを、各々1%BSAを含むPBSで連続的に希釈して、濃度が500~0.5ナノモル抗体バインディング部位となるようにした。ビーズ希釈液を、等量の10 \times 10⁻¹¹モルの標識と混合した。1時間インキュ

23

ベーション後、遠心によりビーズをペレットにした。上清のサンプル(100 μ L)を、基質(*o*-フェニレンジアミン/ H_2O_2)100 μ Lと混合した。450nmでの発色速度を標準のものと比較して、溶液中に残存するフェニトイン-HRP標識の量を計算した。抗体最高*

250ナノモル抗体結合部位での標識結合量%

	標識A (伸長鎖)
D i l A s 8	93
D i l A s 9	94
D i l A s 14	90
D i l A s 16	96
D i l A s 21	97

【0123】これらの結果は、これらの抗体がAHRP-HD1標識(標識A)を確実に認識することを示している。

【0124】例8-AHRP-HD2(標識B)の加水分解安定性。

本例は、標識とフェニトイン核の間の連結鎖にアミド結合を有する本発明の標識フェニトイン誘導体、AHRP-HD2(標識B)の加水分解安定性を具体的に説明するものである。

【0125】固定化カレストッド(Kallestad)抗体を担持するビーズを、1987年8月3日に出版された米国特許第081,206号明細書(EPA88307172,2発行)に記載されるように製造した。

【0126】AHRP-HD2(標識B)を、pH7.3もしくは8.5に調整した1%BSAを含むPBSで1 $\times 10^{-10}$ モルとなるまで希釈した。その標識を室温で※

250ナノモル抗体結合部位での標識結合量%

	pH7.3	pH8.5
0日	100	--
2日	98	99
6日	99	100

【0129】これらの結果は、連結鎖中にアミド結合を含むAHRP-HD2(標識B)のバインディングが、この時間内で全く分解を示さなかったことを示している。これは、標識Bが加水分解による分解に耐性であるであろうことを示す。このような加水分解は、経過時間に対応するアッセイ応答の変動の原因となったであろう。

24

*濃度(250ナノモル バインディング部位)で試験された固定化抗体に結合した標識の量を報告する。

【0122】

【表1】

※6日間インキュベーションした。その標識を、2日後及び6日後に、固定化抗体によるバインディングについて、以下のように試験した。

【0127】カレストッド(Kallestad)52-2抗体ビーズを、1%BSAを含むPBSで連続的に希釈して、濃度が500~0.50ナノモル抗体バインディング部位となるようにした。ビーズ希釈液を、等量の10 $\times 10^{-11}$ モルの標識と混合した。1時間インキュベーション後、遠心によりビーズをペレットにした。上清のサンプル(100 μ L)を、基質(*o*-フェニレンジアミン/ H_2O_2)100 μ Lと混合した。速度を標準のものと比較して、溶液中に残存する標識の量を計算した。抗体最高濃度(250ナノモル バインディング部位)で試験された固定化抗体に結合した標識の量を報告する。

【0128】

【表2】

う。

【0130】例9-吉草酸エステル及び伸長連結鎖を用いて製造されたフェノバルビタール-HRP標識の比較。

本例では、吉草酸エステル連結鎖を担持する標識(標識D、AHRP-PB2)及び伸長連結鎖を担持する標識

(標識F、AHRP-PB1)を結合する、数種の固定化抗体(Ka11 1571及びPbAs,)の能力を比較した。

【0131】固定化抗体ビーズ試料を、以下のように製造した。ポリマービーズ(30mg)〔ポリ(スチレン-
コ-P-ビニルベンジル2-クロロエチルスルホン)
(モル比95:5)〕を、緩衝液(0.1モルEPP
S、pH8.5)1mLに分散し、そして抗体(Ka11
1571もしくはPbAs,)0.3mgを添加した。総
容量を1.5mLにした。その混合物を室温で4時間転倒
回転させた。次いで、BSAの10%溶液0.3mLを添
加し、そして上清を取り除き、抗マウスIgGを用いて
未結合抗体について分析した。表面上に結合した抗体の
量をELISAを用いて計算した。そのベレットを、P
BS、pH7.2を用いて、緩衝液への再懸濁及び遠心に
より3回洗浄した。最終再分散液をPBS1.8mLで調
整し、メルチオレート(商標)を0.02%の濃度で添*

100ナノモル抗体結合部位での標識結合量%

	標識D	標識F
Ka11 1571	41%	76%
PbAs9	49%	73%

【0134】

【発明の効果】これらの結果は、本発明により提供され
る標識薬物ハブテン類似体類に対する抗体類の認識が、
改良されていることを示す。少なくとも65%の標識薬
物ハブテン類似体が、過剰の固定化バルビツレートもし
くはヒダントイン抗体によって結合されうる。伸長連結
鎖を担持する標識類似体類、特に連結鎖中にアミド結合
を有するものは、実際に本発明を低減するのに用いられ
るいかなるタイプの固定化抗体によっても、同様に結合
される。また、伸長連結鎖中にアミドを有する誘導体類
は、加水分解に対して非常に安定である。上記ヒダント
イン誘導体類の使用により、幾つかの利点が認められ ※

* 加し、そして生成物を使用するまで4℃で保存した。

【0132】標識を結合する固定化抗体の能力を以下の
ように測定した。各種の抗体ビーズを、各々1%BSA
を含むPBSで連続的に希釈して、濃度が200~0.
50ナノモル抗体バインディング部位となるようにし
た。ビーズ希釈液を、等量の 10×10^{-11} モルのフェ
ノバルビタール-HRP標識と混合した。1時間インキ
ュベーション後、遠心によりビーズをベレットにした。
上清のサンプル(100μL)を、基質(ο-フェニレ
ンジアミン/ H_2O_2)100μLと混合した。450
nmでの発色速度を標準のものと比較して、溶液中に残存
するフェノバルビタール-HRP標識の量を計算した。
抗体最高濃度(100ナノモルバインディング部位)で
試験された固定化抗体に結合した標識の量を報告する。

【0133】

【表3】

※。ヒダントインもしくはフェノバルビタール核と活性
エステル基の間に短い連結鎖を有するこれらのヒダント
イン誘導体類の活性エステルは、若干の固定化抗体との
使用に際して受け入れられる酵素標識を製造する場合に
は、HRPと十分に反応性であった。活性エステル基と
ヒダントイン核の間に8~20個の原子から成る長い連
結基(R^2 に加えて角型括弧基)を担持する誘導体類
は、試験されるすべての固定化抗体により結合できる標
識を提供した。連結鎖中の各Zが、隣接するカルボニル
とアミド基を形成する-NR-であるような鎖は加水分
解に対して耐性である。

フロントページの続き

(72)発明者 マーシャ ディー、バイル エーニック
アメリカ合衆国、ニューヨーク 14610,
ロチェスター、サン ガブリエル ドライ
ブ 44

(72)発明者 イグナツィオ サルバトーレ ボンティチ
エロ

アメリカ合衆国、ニューヨーク 14534,
ビッツフォード、コッパー ウッズ 21

(72)発明者 デビッド アラン ヒルボーン
アメリカ合衆国、ニューヨーク 14467,
ヘンリエッタ、サザーランド ヒルズ サ
ークル 10

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】平成12年11月24日(2000.11.24)

【公開番号】特開平5-172814
 【公開日】平成5年7月13日(1993.7.13)
 【年通号数】公開特許公報5-1729
 【出願番号】特願平4-145980
 【国際特許分類第7版】
 G01N 33/535
 【F I】
 G01N 33/535

【手続補正書】

【提出日】平成11年5月26日(1999.5.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】 明細書

【発明の名称】 イムノアッセイ用標識薬物ハブテン類似体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) アミン又はスルフヒドリル基を有する、イムノアッセイに用いられるタイプの標識、

(B) ヒダントイン核又はバルビツレート核より選ばれる薬物ハブテン核、及び(C) 前記薬物ハブテン核の3位をカルボニル橋を介して前記標識に連結する連結鎖、を含んで成る標識薬物ハブテン類似体であって、前記連結鎖が(1) $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン基、(2) フェニレン基、及び(3) 環窒素原子を介して連結基に結合した5~7員複素環から成る5~40個の原子を有し、前記(1)~(3)の基及び環が

(a) エステル

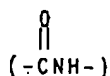
【化1】



(上式中、ZはO又はSである)、

(b) アミド、

【化2】



(c) -O-, -S-及び-NR-より選ばれるヘテロ

原子(ここで、Rは $C_1 \sim C_{10}$ アルキルを表す)、並びに

(d) カルボニルより選ばれる化学基を介して互いに結合しており、ただし、前記連結基が炭素原子数2~12を有する飽和又は不飽和モノカルボン酸の誘導体以外のものであることを条件とする標識薬物ハブテン類似体。

【請求項2】 請求項1の標識薬物ハブテン類似体の製造方法であって、(1) アミン又はスルフヒドリル基を有する標識を、

(a) 活性エステル基、

(b) ヒダントイン核又はバルビツレート核より選ばれる薬物ハブテン核、及び

(c) 前記活性エステル基を前記ヒダントイン核又はバルビツレート核に連結する請求項1に定義される連結鎖を含んで成る過剰の薬物ハブテン類似体と接触させ、そして(2) 透析により、未使用活性エステル及び縮合副生成物を取り除くことを含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、臨床化学、詳細にはイムノアッセイに関する。

【0002】

【従来の技術】 天然の免疫学的反応を利用するイムノアッセイは、臨床化学における分析技術として広範な使用が見出されている。反応の特異性により、それらは生物学的流体中に非常に低濃度で存在する生物学的分析物(analyte)を定量する際に特に有利である。このような分析物(本明細書中ではリガンドと称する)としては、例えば、抗体、治療薬、麻酔薬、酵素、ホルモン及びタンパク質等が挙げられる。

【0003】 競合結合イムノアッセイでは、免疫応答性誘導体及びリガンドの類似体をはじめとする標識リガンド類似体が、所定量の適当な結合性物質(本明細書中ではレセプターと称する)との反応を目当てに未標識リガンド競合した状態に置かれる。リガンドの未知濃度は、結合もしくは未結合(すなわち遊離)の標識リガンドの

どちらか一方のシグナルを測定することより求めることができる。反応は以下のように進行する。

【0004】リガンド + 標識リガンド + レセプター → リガンド-レセプター + 標識リガンド-レセプター

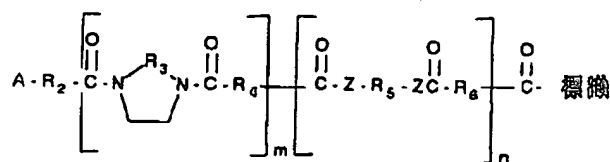
【0005】常用される標識としては、放射性標識、酵素、発色団、蛍光団、安定な遊離基並びに酵素の補因子、阻害剤及びアロステリックエフェクターが挙げられる。

【0006】上述したと矛盾することなく、血清中の薬物誘導体（例えばフェノバルビタールやフェニトイン）についてのイムノアッセイは、固定化抗体の結合部位をターゲットにした、そのような薬物の酵素標識類似体と患者血清中の薬物との競合反応に基づくことができる。

【0007】標識薬物ハブテン類似体（以下、LDHと称することがある）についての特定の必要条件は、1）少なくとも65%のLDHが過剰の固定化抗体により結合されることが；2）固定化抗体に対するLDHの親和性が、所定量のLDHと薬物との競合が治療に関連した薬物濃度範囲で起こるようなものであること；及び3）保存条件下におけるその酵素標識の加水分解に対するLDHの安定性；を含む。

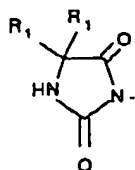
【0008】薬物ハブテン類似体に課せられる必要条件は、1）酵素標識との結合後の固定化抗体に対する類似体の接近しやすさ；2）薬物に対する抗体による、標識類似体の特異的認識；及び3）酵素活性に悪影響を与えない条件下、直接に又は酵素もしくは類似体の活性化後*

(I)



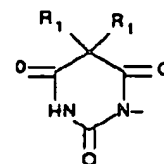
【0013】上式中、Aは次式のヒダントイン核

【化4】



又は次式のパルビツレート核

【化5】



*のいずれかでの、酵素標識との薬物類似体の十分な反応性；を含む。

【0009】米国特許第4,752,568号明細書に開示されたグルコースオキシダーゼ（GOD）及びアルカリ性ホスファターゼ（ALP）酵素標識結合フェノバルビタール及びフェニトインハブテン類似体は、所望のフォーマットで有効な競合イムノアッセイを遂行するのに適切な酵素標識類似体を提供した。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】標識として酵素西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を用いる場合に、前記米国特許明細書に開示された標識フェノバルビタール及びフェニトイン類似体が、競合イムノアッセイを遂行するのに不十分であることが課題である。このような類似体とHRPとのカップリング反応は、緩慢かつ不完全であった。更に、フェノバルビタール-HRP標識及びフェニトイン-HRP標識は非常に弱い結合であったので、判読可能なシグナルを得るのに非常に高濃度の標識又は抗体結合部位が必要とされるであろう。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記の構造に相当する、請求項1の標識薬物ヒダントインおよびパルビツレート類似体を提供する：

【0012】

【化3】

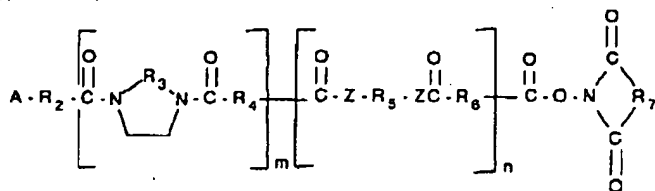
を表し、

【0014】R¹は各々独立して、水素、炭素原子数1～10のアルキル、未置換又は置換フェニルを表し、R²、R³、R⁴及びR⁶は各々独立して、C₁～C₁₀アルキレン基を表すか又は少なくとも1つ以上のエステル基、アミド基、-O-、-S-もしくは-NR-を割り込ませたC₁～C₁₀アルキレン基を表し、R⁵はC₁～C₁₀アルキレンを表し、Zは-O-、-S-及び-NR-（ここで、Rは水素又はC₁～C₁₀アルキル、例えばメチル、プロピル及びヘキシルを表す）を表し、

【0015】mは0、1又は2でありnは0、1又は2でありm+n>0であり、そしてm、n及びR'に含まれる原子の総数が5～40であり、標識は酵素であり、そして更に、

【0016】(i) R¹ 基の少なくとも1つが置換又は未置換フェニルであり、(ii) R¹、R² 及び R³ のうちの1つがフェニレンであってもよく、(iii) 式Iの角括弧中の成分がいずれの順序であってもよく、そして(iv) 連結基が、炭素原子数2～12の飽和又は不飽和モノカルボン酸の誘導体以外のものであることを条件とする。

【0017】上記定義に従って、R¹ は水素、メチル、プロピル、ヘキシル、デシル、未置換フェニルであるか又は炭素原子数1〜6個のアルキルにより、ニトロにより、ハロゲンにより、シアノによりもしくは炭素原子数1〜6個のアルコキシにより置換されたフェニルを表すことができ、R²、R³、R⁴及びR⁵は各々独立して、エチレン、ブチレン、ペンチレン、オクチレンから選ばれるアルキレンであるか、又は少なくとも1つ以上のエステル基、アミド基、-O-、-S-もしくは-N*



【0022】上式中、A、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、Z、m及びn並びにそれらに関連する条件は、先に定義のとおりであり、そしてR⁷は、エチレン又は σ -フェニレン基である。

【0023】製造例

ヒダントイン薬物ハブテン類似体

ヒダントイン類似体は、ヒダントイン化合物のサブクラスであるフェニトイン類似体が製造される下記製造方法に従って製造できる。

【0024】例1-HD1:5, 5-ジフェニル-3-(4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニルオキシ)エチルアミノカルボニル]ブチル)ヒダントインの製造。

【0025】工程1：5，5-ジフェニル-3-〔4-
(2-ヒドロキシエチルアミノカルボニル)ブチル]ヒ
ダントインの製造。

【0026】パートA：最初に酸塩化物を製造する。3-(4-カルボキシブチル)-5,5-ジフェニル-2,4-イミダゾリジンジオン (3.52 g, 0.01 mol)、塩化チオニル (20 mL)、N,N-ジメチルホルムアミド (2 滴) 及びクロロホルム (50 mL) の混合物を、室温で3時間攪拌した。減圧下でロータリーエバポレーター中で溶剤を留去し、その生成物を次のパートBに直接用いた。

* R-を割り込ませた前記のようなアルキレンを表し、R¹はメチレン、エチレン又はトリメチレンを表し、Zは各々独立して、-O-、-S-又は-NR-（ここで、Rは、少なくとも1つの水素、メチル、プロピル又はヘキシルを表す）を表し、そして標識は酵素を表す。

【0018】標識薬物ハブテン類似体は、以下に記載される新規薬物ハブテン類似体より製造した。

【0019】それらは一般的に下記を含んで成る。

(a) 活性エステル基、例えば、スクシンイミドオキシカルボニル、(b) ヒダントイン核又はバルビツレート核、及び(c) 前記活性エステル基を前記ヒダントイン核又はバルビツレート核に連結する連結鎖(ここで、連結鎖は前に定義した通りである)。

【0020】より具体的には、本発明の好ましい新規ヒダントイン活性エステルは、次式の構造を有するものである。

【0021】

【化6】

【0027】パートB：上記酸塩化物をエタノールアミンと反応させる。クロロホルム（50 mL）中の上記酸塩化物を、クロロホルム100（mL）中のエタノールアミン（1.2 g, 0.02モル）及びトリエチルアミン（2.4 g, 0.024モル）の混合物に15分間かけて滴下添加した。次いで混合物を60℃で2時間加熱し、そして室温で1時間攪拌した。次いでその溶液を5%塩酸（100 mL×2）で洗浄し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液（100 mL）で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして溶剤をロータリーエバポレーター中で留去した。次いで濾液を酸化アルミニウムカラムを用いるクロマトグラフィーにかけ、TLC上に1つのスポットを示す物質（3.0 g）を得た。この物質を次の製造方法に直接使用した。

【0028】工程2：3-〔4-〔2-（3-カルボキシプロピオニルオキシ）エチルアミノカルボニル〕ブチル〕-5，5-ジフェニルヒダントインの製造。
クロロホルム（100ml）中の工程1のヒドロキシ化合物（3.0g，0.0075モル）、無水コハク酸（1.0g，0.01モル）及びジメチルアミノピリジン（0.9g，0.0075モル）の混合物を50～60℃で4時間加熱し、そして週末の間室温まで放冷した。

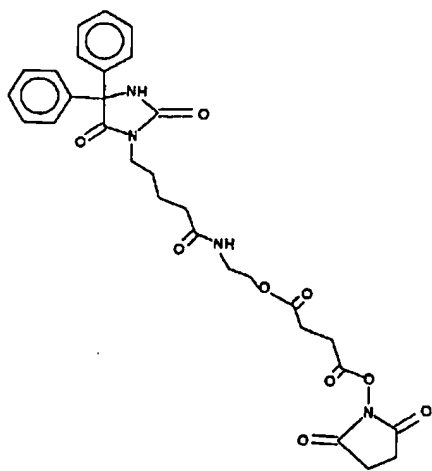
【0029】ジクロロメタン（300 mL）を添加し、そ

して混合物を5%塩酸溶液(100mL×3)で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして溶剤を留去してTLC上に1つのスポットを与える物質を得た。

【0030】工程3: HD1: 5, 5-ジフェニル-3-{4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニルオキシ)エチルアミノカルボニル]ブチル}ヒダントインの製造。

【0031】

【化7】



【0032】クロロホルム(80mL)中の工程2からの酸(3.0g, 0.006mol)、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.5g, 0.007mol)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(0.7g, 0.006mol)の混合物を室温で20時間攪拌した。その混合物を濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーター中で濾液を濃縮した。次いで残渣をシリカを用いるクロマトグラフィーにかけ、生成物を1.3g得た(収率40%)。C₃₃H₃₂N₂O₇についての分析計算値: C, 60.8; H, 5.44; N, 9.45。実測値: C, 59.6; H, 5.51; N, 8.91。

【0033】例2-HD2: 5, 5-ジフェニル-3-{4-[4-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニル)-1-ビペラジニルカルボニル]ブチル}-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0034】工程1: 5, 5-ジフェニル-3-(1-ビペラジニルカルボニルブチル)ヒダントインの製造。

【0035】パートA: 最初に、3-{4-(4-ベンジルオキシカルボニルビペラジニルカルボニル)ブチル}-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオンを製造した。

【0036】上記HD1の製造のパートAに記載されるように製造した酸塩化物(0.01mol)を、クロロホルム(50mL)中のベンジル1-ビペラジニルカルボキシ

レート(2.4g, 0.011mol)及びトリエチルアミン(2.0g, 0.02mol)の混合物に、15分間かけて滴下添加した。この混合物を室温で一晩攪拌し、そしてジクロロメタン(300mL)を添加した。その混合物を5%塩酸(100mL×2)で洗浄し、希炭酸ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで濾液を乾燥し、濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーター中で溶剤を留去した。次いで濾液をクロマトグラフィーにかけ、油状物4.3gを得た(収率78%)。これを次の工程に直接使用した。

【0037】パートB: 工程Aの保護アミン(4.8g, 0.008mol)及び30~35%臭化水素-酢酸(HBr/AcOH)溶液(25mL)を室温で1.5時間攪拌した。次いでこの混合物をジエチルエーテル(1L)に注ぎ入れ、そして分離した油状物を新たなエーテル(1L×3)で摩砕した。その油状物を10%水性酸化ナトリウム溶液(pH=14)中に溶解し、そしてこの水性溶液をジクロロメタン(100mL×4)で抽出した。合わせた有機溶液を飽和塩化ナトリウム溶液(150mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下、ロータリーエバポレーター中で溶剤を留去した。濾液は固化して白色固体を与えた(2.6g, 収率77%)。この物質を次の工程に直接用いた。

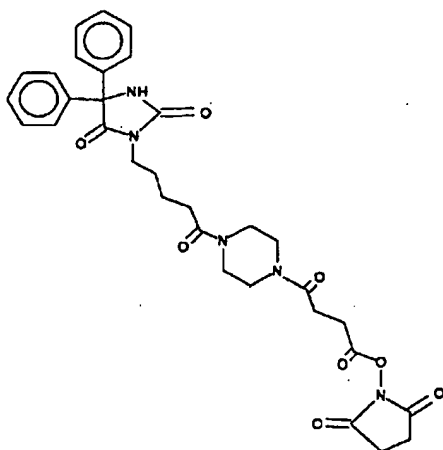
【0038】工程2: 3-{4-[4-(3-カルボキシプロピオニル)-1-ビペラジニルカルボニル]ブチル}-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0039】クロロホルム(15mL)中のパートBからのアミン(2.1g, 0.005mol)と無水コハク酸(0.54g, 0.0054mol)の混合物を50~60℃で30分間加熱し、そして周囲温度で20時間放置した。ジクロロメタン(150mL)を添加し、そして混合物を5%塩酸(100mL×2)で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーター中で溶剤を留去したところ、白色固体2.5g(95%)が得られ、これを次の工程に直接用いた。

【0040】工程3: HD2: 5, 5-ジフェニル-3-{4-[4-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニル)-1-ビペラジニルカルボニル]ブチル}-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0041】

【化8】



【0042】クロロホルム（40 mL）中の工程2からの酸（1.56 g, 0.003モル）、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（0.64 g, 0.003モル）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（0.36 g, 0.003モル）の混合物を室温で週末の間攪拌した。その混合物を濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーターで濾液から溶剤を留去して生成物1.9 gを得た（収率100%）。その固体をクロマトグラフィーにかけ、そして生成物画分をジクロロメタン（200 mL）に溶解し、希炭酸ナトリウム溶液（100 mL×2）で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そしてロータリーエバポレーター中で溶剤を留去したところ、TLC上に1つのスポットを与える白色固体が得られた。 $C_{31}H_{41}N_3O_5$ の分析計算値：C, 62.23; H, 5.71; N, 11.34。実測値：C, 59.07; H, 5.40; N, 10.45。

【0043】例3-HD3: 5, 5-ジフェニル-3-{4-[6-(3-スクシンイミドオキシカルボニル)プロピオンアミド]ヘキシルアミノカルボニル}ブチル}-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0044】工程1: 3-[4-(6-アミノヘキシルアミノカルボニル)ブチル]-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0045】パートA: 3-[4-(6-ベンジルオキシカルボニルアミノヘキシルアミノカルボニル)ブチル]-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

HD1の製造で中間体として生成された酸塩化物物を、HD2の製造の工程1に記載の方法により、N-ベンジルオキシカルボニル-1, 6-ヘキサジアミンで処理したところ、保護アミン7.5 g、収率85%が得られた。

【0046】パートB: パートAの保護アミンを、HD2の製造の工程1、パートBの方法により臭化水素酸-酢酸で処理したところ遊離アミンが得られ、精製するとなくそれを工程2に用いた。

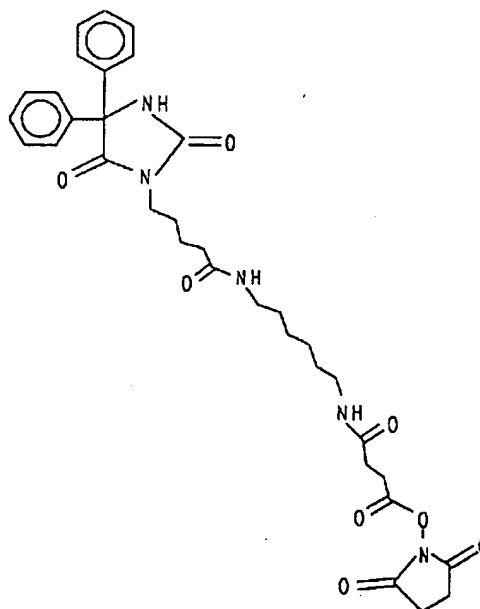
【0047】工程2: 3-[4-[6-(3-カルボキシプロピオンアミド)ヘキシルアミノカルボニル]ブチル]-5, 5-ジフェニル-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

この化合物を、HD2の製造の工程2と同様の方法を用いて製造した。 $C_{31}H_{41}N_3O_5$ についての分析計算値：C, 65.44; H, 6.96; N, 10.17。実測値：C, 63.26; H, 7.01; N, 9.39。

【0048】工程3: HD3: 5, 5-ジフェニル-3-[4-[6-(3-スクシンイミドオキシカルボニル)プロピオンアミド]ヘキシルアミノカルボニル]ブチル}-2, 4-イミダゾリジンジオンの製造。

【0049】

【化9】



【0050】この物質を、HD2の製造の工程3の方法を用いて製造したところ、生成物2.6 gを得た（収率80%）。融点133~134°C。 $C_{31}H_{41}N_3O_5$ についての分析計算値：C, 63.05; H, 6.38; N, 10.81。実測値：C, 62.91; H, 6.41; N, 10.69。

【0051】バルビツレート薬物類似体

以下の例4~8は、フェノバルビタールについてのバルビツレート薬物ハブテン類似体の製造を具体的に説明するものである。一般的には、この類似体は、(1)バルビツレート誘導体、例えばフェノバルビタールを、ω-ハロアルカンカルボキシレートエステルと縮合させる工程、(2)前記エステルを、対応する酸にケン化させる工程、(3)前記酸を、対応する酸塩化物に転化させる工程、(4)前記酸塩化物をN-ヒドロキシスクシンイ

ミドと縮合させるか又は更に長い連結鎖を得るために、アミン又はヒドロキシ基の1つが保護されたジアミン、ジオール又はアミノアルコールと縮合させる工程、及び(5)保護基を除去し、ジカルボン酸、例えばコハク酸と縮合させ、次いでN-ヒドロキシスクシンイミドと縮合させて、類似体を製造する工程、により製造される。

【0052】所望であれば、半分保護されたジアミン、ジオール又はアミノアルコールと縮合させ、次いで別の二酸を1回又は2回以上繰り返して、連結鎖を更に長くすることができる。しかしながら、より長い鎖の二酸、ジオール、ジアミン、アミノアルコール又はハロアルカンカルボキシレートエステルを用いることにより、より少ない工程で同様の製造が達成できる。

【0053】例4-PB1: 5-エチル-5-フェニル-1-[4-(4-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル)ブチル]-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン¹の製造。

【0054】工程1: 5-エチル-6-ヒドロキシ-3-(4-メトキシカルボニルブチル)-5-フェニル-2, 4(3H, 5H)-ピリミジンジオリ²の製造。

ジクロロメタン(500mL)中のフェノバルビタール(46.5g, 0.2モル)と水酸化テトラブチルアンモニウム(500mL, 0.2モル, 0.4M水溶液)の混合物を製造し、そしてそれに5-プロモ吉草酸メチル(39.0g, 0.2モル)を添加した。その反応混合物を一晩(20時間)激しく攪拌した。この混合物に、飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)を添加し、有機層を分離し、そして水性溶液をジクロロメタン(100mL×2)で洗浄した。合わせた有機溶液を飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥し、濾過し、そして溶剤を留去した。

【0055】工程2: 3-(4-カルボキシブチル)-5-エチル-6-ヒドロキシ-5-フェニル-2, 4(3H, 5H)-ピリミジンジオリ²の製造。

ジオキサン(500mL)中の工程1の5-エチル-6-ヒドロキシ-3-(4-メトキシカルボニルブチル)-5-フェニル-2, 4(3H, 5H)-ピリミジンジオリ²エステル(54.0g, 0.156モル)、濃塩酸(55mL)及び水(55mL)の混合物を4時間加熱して還流させ、そして室温で一晩放置した。ジオキサンを減圧下で留去し、そして飽和塩化ナトリウム溶液(250mL)とジクロロメタン(400mL)を残渣に加えた。有機層を分離し、そして水性溶液をジクロロメタン(150mL×3)で抽出した。合わせた有機溶液を飽和塩化ナトリウム溶液(200mL)で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥し、濾過し、そして溶剤を留去した。残渣にジエチルエーテルを添加し、そしてその混合物を週末の間-16℃の冷凍庫に置き、次いで濾過した。

【0056】工程3: 1-(4-クロロカルボニルブチル)-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオリ³の製造。

工程2からの酸(6.6g, 0.2モル)、塩化チオニル(50mL)、N,N-ジメチルホルムアミド(2滴)及びクロロホルム(80mL)の混合物を室温で1.5時間攪拌した。減圧下ロータリーエバポレーターで溶剤を留去し、そしてこの生成物を次の工程4に直接用いた。

【0057】工程4: 1-[4-(4-ベンジルオキシカルボニル-1-ビベラジニルカルボニル)ブチル]-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオリ³の製造。

クロロホルム(75mL)中の工程3の酸塩化物(0.2モル)を、クロロホルム(100mL)中のベンジル1-ビベラジニルカルボキシレート(6.0g, 0.030モル)とトリエチルアミン(4.0g, 0.04モル)の混合物に15分間かけて滴下添加した。この混合物を室温で20時間攪拌し、次いでジクロロメタン(300mL)を添加した。その混合物を10%塩酸溶液(100mL×3)で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして溶剤を留去した。次いで残渣をSiO₂上でのクロマトグラフィーにかけて固体を得た。

【0058】工程5: 5-エチル-5-フェニル-1-[4-(1-ビベラジニルカルボニル)ブチル]-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオリ³臭化水素酸塩⁴の製造。

工程4からの保護アミン(6.5g, 0.012モル)及び30~35%臭化水素-酢酸溶液(30mL)を室温で1.5時間攪拌した。次いでその混合物を酢酸エチル(2L)中に注ぎ入れ、1時間攪拌し、濾過し、そして固体を酢酸エチル500mLで洗浄した。

【0059】工程6: 1-[4-(4-(3-カルボキシプロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル)ブチル]-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオリ³の製造。

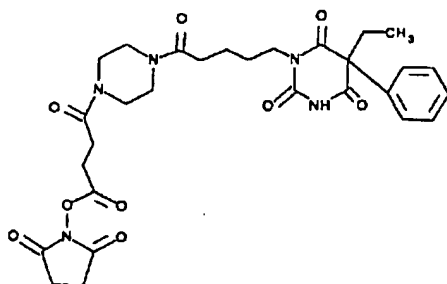
クロロホルム(150mL)中の工程5のアミン(4.8g, 0.01モル)、無水コハク酸(1.2g, 0.012モル)及びトリエチルアミン(2.2g, 0.02モル)の混合物を、50~60℃(湯浴)で30分間加熱し、そして周囲温度で16時間攪拌した。ジクロロメタン(200mL)を添加し、混合物を10%塩酸溶液(100mL×3)で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液(100mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーター中で溶剤を留去すると、白色固体3.3gが得られた(収率66%)。この物質をSiO₂カラムを用いるクロマトグラフィーにかけたところ、白色固体が得られた。

【0060】工程7: 5-エチル-5-フェニル-1-[4-(4-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオニル)-1-ビベラジニルカルボニル)ブチル]

-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジントリオン
の製造。

【0061】

【化10】

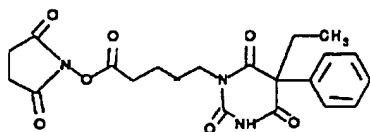


【0062】クロロホルム (75 mL) 中の工程6からの酸 (3.4 g, 0.007 モル)、N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド (1.6 g, 0.008 モル) 及びN-ヒドロキスクシンイミド (1.0 g, 0.008 モル) の混合物を室温で20時間攪拌した。その混合物を濾過し、そして酢酸エチル (100 mL) を添加した。その有機溶液を水 (100 mL×2) で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液 (50 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下ロータリーエバポレーターで溶剤を留去した。固体の一部をクロマトグラフィーにかけたところ、白色固体が得られた。

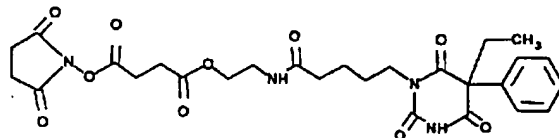
【0063】例5-PB2: 5-エチル-5-フェニル-2-(4-スクシンイミドオキシカルボニルブチル)-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジントリオンの製造。

【0064】

【化11】



【0065】工程2の酸と共に攪拌すること以外は、例*



【0071】例4の工程7に概略された方法を用いて、本例の工程2の酸を用いて開始してこの物質を製造した。

【0072】例7-PB4: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[3-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオンアミド)プロピルアミノカルボニル]ブチル}-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジン

* 4の工程7の方法を用いてこの物質を製造した。その物質をエチルエーテル/酢酸エチル (1:1) から結晶化したところ、白色固体が得られた。

【0066】例6-PB3: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオンオキシ)エチルアミノカルボニル]ブチル}-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジントリオンの製造。

【0067】工程1: 5-エチル-1-{4-(2-ヒドロキシエチルアミノカルボニル)ブチル}-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジントリオンの製造。

ベンジル1-ビペラジンカルボキシレートの代わりに2-ヒドロキシエチルアミンを用いる以外は、例4の工程4に概説されたようにこの物質を製造した。

【0068】工程2: 1-{4-[2-(3-カルボキシプロピオンオキシ)エチルアミノカルボニル]ブチル}-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジントリオンの製造。

クロロホルム (100 mL) 中の工程1からの生成物 (2.9 g, 0.007 モル)、無水コハク酸 (0.7 g, 0.007 モル) 及びジメチルアミノピリジン (0.9 g, 0.007 モル) の混合物を湯浴 (50~60℃) 中で30分間加熱し、次いで室温で3日間攪拌した。ジクロロメタン (300 mL) を添加し、そして混合物を10%塩酸溶液 (100 mL×2) で洗浄し、飽和塩化ナトリウム溶液 (100 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして溶剤を留去したところ、油状物が得られ、それを次の工程に直接用いた。

【0069】工程3: PB3: 5-エチル-5-フェニル-1-{4-[2-(3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオンオキシ)エチルアミノカルボニル]ブチル}-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジントリオンの製造。

【0070】

【化12】

トリオンの製造。

【0073】工程1: 1-{4-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノプロピルアミノカルボニル)ブチル}-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H) -ピリミジントリオンの製造。

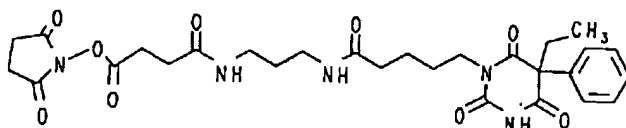
ベンジル1-ビペラジンカルボキシレートの代わりにN-ベンジルオキシカルボニル-1, 3-プロパンジアミ

ンを用いる以外は、例4の工程4に概略された方法を用いてこの物質を製造し、そして粗製物質を次の工程に用いた。

【0074】工程2：1-〔4-〔3-アミノプロピルアミノカルボニル〕ブチル〕-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ビリミジントリオン臭化水素酸塩の製造。

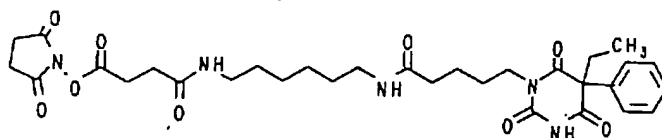
例4の工程5のようにこの物質を製造した(本例の工程1のアミドを用いて開始し、エチルエーテル中に注ぎ入れると油状物が得られたことを除いて)。

【0075】工程3：1-〔4-〔3-〔3-カルボキシプロピオンアミド〕プロピルアミノカルボニル〕ブチル〕-5-エチル-5-フェニル-2, 4, 6 (1H, *



【0078】本例の工程3の酸を用いて開始する以外は、例4の工程7の方法を用いてこの物質を製造した。

【0079】例8-PB5：5-エチル-5-フェニル-1-〔4-〔6-〔3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオンアミド〕ヘキシルアミノカルボニル〕ブチル〕-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ビリミジントリオン臭化水素酸塩の製造。



【0081】例7の工程1のN-ベンジルオキシカルボニル-1, 3-プロパンジアミンの代わりにN-ベンジルオキシカルボニル-1, 6-ヘキサンジアミンを使用し、そしてその後の工程2, 3及び4で各々それからの反応生成物を用いること以外は、例7の反応順序に従ってこの化合物を製造した。

【0082】

【具体的な態様】本発明者らは、上記で調製したバルビツレート及びヒダントインの新規標識薬物ハブテン類似体を製造した。それらはバルビツレート及びヒダントイン薬物、特にフェノバルビタール及びフェニトインについての競合イムノアッセイにおいて有用である。標識は、競合イムノアッセイにおいて分析物又は分析物類似体と共に常用される、アミン又はスルフヒドリル基を有するイムノアッセイ用の標識、例えば酵素、可視色素、ロイコ色素、蛍光色素及び放射性物質等である。

【0083】有用な標識は、酵素、例えばアルカリ性ホスファターゼ(ALP)、グルコースオキシダーゼ(GOD)及び西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)もしくはアミン富化西洋ワサビペルオキシダーゼ(AHRP)である。

【0084】標識薬物ハブテン類似体は、下記工程を含

* 3H, 5H)-ビリミジントリオン臭化水素酸塩の製造。

本例の工程2からのアミンを用いて開始して酸を得たこと以外は、例4の工程6の方法により、この物質を製造した。

【0076】工程4：PB4：5-エチル-5-フェニル-1-〔4-〔3-〔3-スクシンイミドオキシカルボニルプロピオンアミド〕プロピルアミノカルボニル〕ブチル〕-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ビリミジントリオン臭化水素酸塩の製造。

【0077】

【化13】

※チル〕-2, 4, 6 (1H, 3H, 5H)-ビリミジントリオン臭化水素酸塩の製造。

【0080】

【化14】

んで成る新規方法を用いて製造される。

1) 求核基、例えばアミン又はスルフヒドリル基を表面上に担持する標識を、過剰の上記バルビツレート又はヒダントイン薬物ハブテン類似体と接触させる工程。好ましくは類似体と標識を水混和性有機溶剤、例えばN, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド(DMSO)又は溶剤と水(緩衝化したもの)の混合物に溶解した後、一緒に混合する工程、及び

2) 未使用活性エステル及び縮合副生成物を、好ましくは透析により取り除く工程。

【0085】

【実施例】本明細書の以下に提供される実施例は、本発明の新規標識類似体の製造を実証するものである。標識類似体は、フェニトイン及びフェノバルビタール薬物ハブテン類似体を用いて製造した。

【0086】実施例1-アミン富化HRP標識ヒダントインHD1〔伸長連結鎖を含む；標識AHRP-HD1(標識A)〕の製造。

【0087】HD1を、10 mM 4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む乾燥DMF(DMF 4'-HA)

1.452 mLに溶解した。

【0088】アミン富化HRPを以下のように製造し

た。乾燥HRPを0.1M MES緩衝液(pH 5.5)に溶解して、緩衝液10mL中の最終濃度が 2.5×10^{-6} モル(100mq)となるようにした(MES=2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)。変換係数 A_{493} 1mq/mL=2.24を用いて A_{493} 測定値からタンパク質濃度を求めた。HRP溶液を、0.1M MES緩衝液(pH 5.5)10mL中に溶解したL-リジン-塩酸塩 1.5×10^{-3} モル(275mq)と合わせた。新たに調製したMES緩衝液中の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC, 5×10^{-4} モル, 960mL)の溶液を添加した。容器に蓋をし、そして室温で一晩混合した。その反応生成物を0.02M MOPS緩衝液(pH 7.0)(3L, 10°C)に対して透析した。透析緩衝液を3回変えた。MOPS=3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸。

【0089】反応させる前に、アミン富化HRPの試料を、30,000NMWL(呼称分子量限界カットオフ)のCentricells 遠心限外濾過膜を用いて、MOPS緩衝液から0.1M EPPS緩衝液(pH 8.0)に交換した。次いで、この試料を希釈して、最終濃度10mq/mLの溶液を得た。

【0090】アミン富化HRP(AHRP)(1mL)をジメチルホルムアミド中の4'-ヒドロキシアセトアニリドの10mM溶液(DMF 4'-HA)500μLと渦動攪拌により混合し、次いでそれを42°Cの水浴中に置いた。乾燥DMF-4'-HA溶液1.452mL中に21mqのHD1を溶解することにより調製したHD1溶液(500μL)を、フェニトイン/HRPのモル比が50/1となるように、渦動攪拌により混合しながらAHRPに滴下添加した。その反応混合物を42°Cの水浴中で穏やかに振盪させながら1時間インキュベーションした。

【0091】反応混合物を、更なるDMF 4'-HA/0.1M EPPS(1:1)0.5mLを用いて反応容器をすすいだすすぎ液と一緒に、Spectrapor #2 透析チューブに入れた。

【0092】反応混合物を以下のように透析した。

- 1LのDMF 4'-HA/0.1M EPPS(1:1), pH 8.0に対して42°Cで1時間、
- 透析条件a)を用いてもう1回繰り返す、
- 2Lの0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む0.1M EPPS, pH 8.0に対して8°Cで15時間、
- 2Lの0.1M EPPS, pH 8.0に対して8°Cで3時間、
- 3Lの0.04M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩(トリスHCl)/0.15M NaCl, pH 7.5に対して8°Cで3時間、そしてf)透析条件e)を用いて3時間、もう1回繰り返す。

【0093】透析後、0.02%メルチオレート(mert

hioate)(商標)を防腐剤として添加し、そしてAHRP-HD1を冷蔵保存した。

【0094】実施例2-アミン富化HRP標識HD2〔アミド結合を有する伸長連結鎖を含む、標識AHRP-HD2(標識B)〕の製造。

【0095】HD2(15.5mq)を、10mM 4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む乾燥DMF(DMF 4'-HA)1.031mLに溶解した。

【0096】標識製造例1に記載されるように製造したAHRPの溶液(10mq/mL, 0.1M EPPS溶液, pH 8.0中, 1mL)を、DMF 4'-HA 500μLと渦動攪拌により混合し、次いでそれを42°Cの水浴中に置いた。渦動攪拌により混合しながら、上記HD2溶液(500μL)を、モル比が50/1となるようにAHRP溶液に滴下添加した。反応混合物を42°Cの水浴中で穏やかに振盪させながら1時間インキュベーションした。

【0097】反応生成物をSpectrapor #2 透析チューブに入れ、そして以下のように透析した。

- 1LのDMF 4'-HA/0.1M EPPS(1:1), pH 8.0に対して42°Cで1時間、
- 透析条件a)を用いてもう1回繰り返す、
- 1.5Lの0.1%BSA含有0.1M EPPS, pH 8.0に対して8°Cで1.5時間、
- 1.5Lの0.1M EPPS, pH 8.0に対して8°Cで18時間、
- 1.5Lの0.04M トリスHCl/0.15M NaCl, pH 7.5に対して8°Cで2時間、そして
- 透析条件e)を用いて4時間、もう1回繰り返す。

【0098】透析後、0.02%メルチオレートを防腐剤として添加した。標識ヒダントイン誘導体を冷蔵庫に保存した。

【0099】実施例3-AHRP-HD3〔アミド結合を有する伸長連結鎖を含む、標識AHRP-HD3(標識C)〕の製造。

【0100】HD3(9.2mq)を10mM 4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む乾燥DMF(DMF 4'-HA)1mLに溶解した。

【0101】標識製造例1に記載されるように調製したAHRPの溶液を、0.1M EPPS緩衝液(pH 8.0)に対して透析した。最終濃度が5.71mq/mLとなるようにした。

【0102】AHRP(1mL)を渦動攪拌しながらDMF 4'-HA 500μLと混合し、次いでそれを42°Cの水浴中に置いた。上記HD3溶液(500μL)を、HD3/AHRPのモル比が50/1となるように、渦動攪拌により混合しながらAHRPに滴下添加した。反応混合物を42°Cの水浴中で穏やかに振盪させながら1時間インキュベーションした。反応混合物を、DMF 4'-HA/0.1モルEPPS(1:1)0.

5mLを用いて反応容器をすすいだすすぎ液と一緒にSpectrapor #2 透析チューブに入れた。

【0103】反応混合物を以下のように透析した。

- a) 1LのDMF 4'-HA/0.1M EPPS (1:1), pH 8.0に対して42℃で1時間、
- b) 透析条件a)を用いてもう1回繰り返す、
- c) 1.5Lの0.1%BSA含有0.1M EPPS, pH 8.0に対して5℃で15時間、
- d) 1.5Lの0.1M EPPS, pH 8.0に対して8時間、
- e) 2Lの0.02M 3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS), pH 7.0に対して5℃で13時間、そして
- f) 透析条件e)を用いて2回繰り返す。

【0104】透析後、0.02%メルチオレート(商標)を防腐剤として添加し、そしてその標識生成物を冷蔵保存した。

【0105】標識バルビツレート薬物ハブテン類似体以下の実施例は、標識バルビツレート薬物ハブテン類似体の製造を具体的に説明するものである。

【0106】実施例4-アミン富化HRP標識PB2(標識AHRP-PB2; 標識D)の製造。

PB2をDMSOに溶解して10.7mg/mL溶液(1.25×10^{-3} M)を得た。次いでこの溶液の500 μ Lを、渦動攪拌により混合しながらアミン富化HRP/DMSO溶液(AHRP/DMFと同様に調製)に滴下添加した。フェノバルビタール/HRPのモル比は50/1であった。

【0107】2400rpmで振盪させながら室温で4時間インキュベーションを行った。その試料をSpectrapor #2 透析チューブに移し、更に透析液1mLを用いて反応容器をすすぎ、そのすすぎ液と一緒に透析管に入れた。標識を0.02M MOPS緩衝液、pH 7.0に対して5~10℃で透析した。この透析条件を、各回2~3Lの緩衝液を用いて3回繰り返した。透析後、0.02%メルチオレート(商標)を防腐剤として添加し、そして標識を冷蔵保存した。

【0108】例5-アミン富化HRP-PB3〔伸長連結鎖を含むAHRP-PB3(標識E)〕の製造。
アミン富化HRPを、Centricell遠心限外濾過膜(30,000呼称分子量限界)を用いてMOPS緩衝液から0.1M EPPS緩衝液、pH 8.0へと交換した。次いでこの試料を4.6mL(0.743mg/mL)に希釈した。

【0109】HRP1mLを小バイアルに入れた(1.85×10^{-3} M)。10mM 4'-ヒドロキシアセトアニリドを含むジメチルホルムアミド(Ardrich 22,705-6)(DMF 4'-HA)500 μ Lをバイアルに添加し、渦動攪拌により混合し、そして42℃の水浴に置いた。

【0110】その間に、PB-3をDMF 4'-HA中に溶解して2.12mg/mL溶液(3.70×10^{-3} M)を得た。この溶液500 μ Lを、渦動攪拌により混合しながら、HRP/DMF 4'-HA溶液に滴下添加した。フェノバルビタール/HRPのモル比は、100/1であった。

【0111】水浴中で穏やかに振盪させながら42℃で1時間インキュベーションを行った。試料を、反応容器をすすぐのに使った追加のDMF 4'-HA/0.1モルEPPS(1:1)1mLと一緒にSpectrapor #2 透析管に移した。

【0112】反応混合物を以下のように透析した。

- a) 1LのDMF 4'-HA/0.1M EPPS (1:1), pH 8.0に対して42℃で1時間、
- b) 透析条件a)を用いてもう1回繰り返す、
- c) 1.5Lの0.1%BSA含有0.1M EPPS, pH 8.0に対して5℃で一晩、
- d) 1.5Lの0.1M EPPS, pH 8.0に対して5℃で8時間、
- e) 2.0Lの0.02M MOPS, pH 7.0に対して5℃で少なくとも8時間、そして
- f) 透析条件e)を2回繰り返す。

【0113】透析後、0.02%メルチオレート(商標)を防腐剤として添加し、そして標識生成物を冷蔵保存した。

【0114】例6-アミン富化HRP-PB1〔標識AHRP-PB1(標識F)；アミド結合を有する伸長連結鎖を含むフェノバルビタールハブテン類似体の活性エステル〕の製造。

【0115】製造したアミン富化HRPを、0.1M EPPS緩衝液、pH 8.0へと緩衝液交換して10mg/mLの溶液(2.5×10^{-4} M)を得た。標識Fは、アミン富化HRP5mL(50mg)を用いて製造した。磁気攪拌プレート上で攪拌しながら、2.5mLのDMSOをゆっくり添加した。その溶液を室温で15分間攪拌した。

【0116】その間に、PB1をDMSOに溶解して14.9mg/mL溶液を得た。この溶液2.5mLを、攪拌下でゆっくりHRP/DMSO溶液に添加した。フェノバルビタール/HRPのモル比は50/1であった。

【0117】2400rpmで振盪させながら室温で5時間インキュベーションを行った。その試料を、反応容器をすすぐのに使った追加の透析液と一緒にSpectrapor #2 透析管に移した。標識を0.02M MOPS緩衝液、pH 7.0に対して5~10℃で透析した。この透析条件を、各回3Lの緩衝液を用いて3回繰り返した。透析後、0.02%メルチオレート(商標)を防腐剤として添加し、そして標識を冷蔵保存した。

【0118】免疫応答性

以下の実施例は、上記標識A~Fの免疫応答性を具体的に示すものである。

【0119】実施例7—標識AHRP-HD1（標識A）の免疫応答性

本例では、標識製造例1からのAHRP-HD1（標識A）を結合する、数種の固定化抗体（DilAs₈, DilAs₉, DilAs₁₄, DilAs₁₆及びDilAs₂₁）の能力を調べる。

【0120】（a）ポリマービーズ試料（各試料には、上述した種類の抗体の1つが共有結合されている）を、1987年8月3日に出願された米国特許出願第081,206号明細書（EP公開第88307172.2号）に記載された方法及び材料を用いて製造した。

【0121】（b）AHRP-HD1（標識A）を結合する固定化抗体の能力を以下のように測定した。各種の抗体ビーズを、1%BSAを含むPBSで系列希釈して、500～0.5nMの抗体バインディング部位の濃度となるようにした。ビーズ希釈液を、同容量の 10×10^{-11} Mの標識と混合した。1時間インキュベーション後、遠心によりビーズをベレットにした。上清の試料（100 μ L）を、基質（ α -フェニレンジアミン/H₂O₂）100 μ Lと混合した。450nmでの発色速度を標準のものと比較して、溶液中に残存するフェニトイン-HRP標識の量を計算した。試験した最大抗体濃度（250nMの結合部位）において固定化抗体に結合した標識の量を報告する。

【0122】

【表1】

250nM抗体結合部位での標識結合量%

	標識A (伸長鎖)
DilAs ₈	93
DilAs ₉	94
DilAs ₁₄	90
DilAs ₁₆	96
DilAs ₂₁	97

【0123】上記結果は、これらの抗体がAHRP-HD1標識（標識A）を非常に良く認識することを示している。

【0124】例8—AHRP-HD2（標識B）の加水分解安定性。

本例は、標識とフェニトイン核の間の連結鎖中にアミド結合を有する本発明の標識フェニトイン誘導体（AHRP-HD2（標識B））の加水分解安定性を具体的に説明するものである。

【0125】固定化 Kallestad（カレストッド）抗体が固定化されたビーズは、1987年8月3日に米国特許出願第081,206号明細書（公開EPA88307172.2）に記載の通りに調製した。

【0126】AHRP-HD2（標識B）を、pH7.3又は8.5に調整した1%BSA含有PBS中に 1×10^{-10} Mとなるまで希釈した。その標識を室温で6日間インキュベーションした。2日後及び6日後に、固定化抗体による結合について、以下のように標識を試験した。

【0127】Kallestad 52-2 抗体ビーズを、1%BSA含有PBSで系列希釈して、500～0.50nM抗体結合部位濃度となるようにした。ビーズ希釈液を同容量の 10×10^{-11} Mの標識と混合した。1時間インキュベーション後、遠心によりビーズをベレットにした。上清の試料（100 μ L）を基質（ α -フェニレンジアミン/H₂O₂）100 μ Lと混合した。速度を標準のものと比較して、溶液中に残存する標識の量を計算した。試験した最大抗体濃度（250nM結合部位）において固定化抗体に結合した標識の量を報告する。

【0128】

【表2】

250nM抗体結合部位での標識結合量%

	標識B (アミド結合)	
	pH7.3	pH8.5
0日	100	—
2日	98	99
6日	99	100

【0129】これらの結果は、連結鎖中にアミド結合を含むAHRP-HD2（標識B）の結合が、この時間に渡って全く分解を示さなかったことを示す。これは、標識Bが加水分解による分解に耐性であろうことを示す。このような加水分解は、時間の経過と共にアッセイ応答の変化を引き起こし得る。

【0130】実施例9—吉草酸エステルと伸長連結鎖を用いて製造されたフェノバルビタール-HRP標識の比較。

本例では、吉草酸エステル連結鎖を有する標識（標識D、AHRP-PB2）及び伸長連結鎖を有する標識（標識F、AHRP-PB1）を結合する、数種の固定化抗体（Kallestad 1571及びPbAs₈）の能力を比較した。

【0131】固定化抗体ビーズ試料を以下のようにして製造した。ポリマービーズ（30mg）【ポリ（スチレン-コ-ポ-ビニルベンジル2-クロロエチルスルホン）（モル比95:5）】を、緩衝液（0.1M EPPS、pH8.5）1mL中に分散し、そして抗体（Kall1571又はPbAs₈）0.3mgを添加した。総容量を1.5mLにした。混合物を室温で4時間転倒回転させた。次いでBSAの10%溶液0.3mLを添加し、そして上清を除去し、抗マウスIgGを用いて未結合抗体について分析した。表面上に結合した抗体の量をELIS

Aを用いて計算した。PBS (pH 7.2) を使って、ベレットを緩衝液中に再懸濁しそして遠心分離することにより3回洗浄した。最終再分散液はPBS 1.8 mL中であり、メルチオレート(商標)を0.02%の濃度になるように添加し、そして生成物を使用するまで4℃で保存した。

【0132】標識を結合する固定化抗体の能力を以下のように測定した。各種の抗体ビーズを、1%BSA含有PBSで系列希釈して、200~0.50 nM抗体結合部位濃度となるようにした。ビーズ希釈液を、同容の1

0×10⁻¹¹ Mのフェノバルビタール-HRP標識と混*

合した。1時間インキュベーション後、遠心分離によりビーズをベレットにした。上清の試料(100 μL)を基質(o-フェニレンジアミン/H₂O₂) 100 μLと混合した。450 nmでの発色速度を標準のものと比較して、溶液中に残存するフェノバルビタール-HRP標識の量を計算した。試験した最大抗体濃度(100 nM結合部位)において固定化抗体に結合した標識の量を報告する。

【0133】

【表3】

	標識 D	標識 F
K a l l 1 5 7 1	4 1 %	7 6 %
P b A s 9	4 9 %	7 3 %

【0134】

【発明の効果】これらの結果は、本発明により提供される標識薬物ハブテン類似体に対する抗体の認識の改良を示す。少なくとも65%の標識薬物ハブテン類似体が、過剰の固定化バルビツレート又はヒダントイン抗体によって結合せらる。伸長連結鎖を有する標識類似体、特に連結鎖中にアミド結合を有するものは、本発明を実用のものに変える際に用いられるどんなタイプの固定化抗体によっても、同様に結合される。伸長連結鎖中にアミドを有する誘導体類は、加水分解に対しても非常に安定である。上記ヒダントイン誘導体の使用により、幾つか

の利点が認められる。ヒダントイン核又はフェノバルビタール核と活性エステル基の間に短い連結鎖を有するこれらのヒダントイン誘導体の活性エステルは、幾つかの固定化抗体と共に使われる許容される酵素標識を製造するのに十分な程にHRPと反応性であった。活性エステル基とヒダントイン核の間に8~20個の原子から成る長い連結基(R' と角括弧中の基)を有する誘導体は、試験した全ての固定化抗体により結合できる標識を提供した。各Zが、隣接するカルボニルと共にアミド基を形成する-NR-であるような連結鎖は、加水分解に対し耐性である。